Supplemento ordinario alla "Gazzetta Ufficiale" n. 229 del 2 ottobre 1986 - Serie generale

Spedizione in abbonamento postale - Gruppo I (70%)

GAZZETTA UFFICIALE DELLA REPUBBLICA ITALIANA

PARTE PRIMA — **Roma - Giovedì, 2 ottobre 1986** — SI PUBBLICA NEL POMERIGGIO DI TUTTI I GIORNI MENO I FESTIVI

DIREZIONE E REDAZIONE PRESSO IL MINISTERO DI GRAZIA E GIUSTIZIA - UFFICIO PUBBLICAZIONE LEGGI E DECRETI - VIA ARENULA 70 - 00100 ROMA
AMMINISTRAZIONE PRESSO L'ISTITUTO POLIGRAFICO E ZECCA DELLO STATO - LIBRERIA DELLO STATO - PIAZZA G. VERDI 10 - 00100 ROMA - CENTRALINO 85081

N. 88

MINISTERO DELL'AGRICOLTURA E DELLE FORESTE

DECRETO MINISTERIALE 21 aprile 1986.

Approvazione dei «metodi ufficiali di analisi per i formaggi».

SOMMARIO

MINISTERO DELL'AGRICOLTURA E DELLE FORESTE

LEGGI E DECRETI

MINISTERO DELL'AGRICOLTURA E DELLE FORESTE

DECRETO MINISTERIALE 21 aprile 1986.

Approvazione dei «metodi ufficiali di analisi per i formaggi».

IL MINISTRO DELL'AGRICOLTURA E DELLE FORESTE

DI CONCERTO CON

I MINISTRI DELLE FINANZE, DELLA SANITÀ E DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

Visti l'art. 43 del regio decreto-legge 15 ottobre 1925, n. 2033, convertito nella legge 18 marzo 1926, n. 562, riguardante la repressione delle frodi nella preparazione e nel commercio di sostanze di uso agrario e di prodotti agrari, e l'art. 108 del regolamento per l'esecuzione dello stesso regio decreto-legge, approvato con regio decreto 1° luglio 1926, n. 1361, i quali prescrivono che le analisi occorrenti in applicazione delle norme contenute nel regio decreto-legge e nel regolamento di esecuzione suddetti dovranno essere eseguite dai laboratori incaricati con i metodi di analisi prescritti da questo Ministero, di concerto con quelli delle finanze e della sanità;

Visto il decreto del Presidente della Repubblica 26 marzo 1980, n. 327 «Regolamento di esecuzione della legge 30 aprie 1962, n. 283, e successive modificazioni, in materia di disciplina igienica della produzione e della vendita delle sostanze alimentari e bevande»;

Ritenuto necessario porre a disposizione di tutti gli istituti e laboratori pubblici idonei metodi di analisi per il controllo dei formaggi, perché le analisi da essi compiute risultino uniformi nei procedimenti e nei risultati;

Sentito il parere della commissione per l'aggiornamento dei metodi ufficiali di analisi per i prodotti agrari e le sostanze di uso agrario — sottocommissione per i formaggi — di cui al decreto ministeriale 11 febbraio 1981, pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* n. 204 del 27 luglio 1981;

DECRETA

Articolo unico

Sono approvati i «metodi ufficiali di analisi per i formaggi» descritti nell'allegato al presente decreto.

Il presente decreto sarà pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* della Repubblica italiana.

Roma, addì 21 aprile 1986

Il Ministro dell'agricoltura e delle foreste
PANDOLFI

Il Ministro delle finanze
VISENTINI

Il Ministro della sanità
DEGAN

Il Ministro dell'industria, del commercio e dell'artigianato
ALTISSIMO

ALLEGATO

METODI UFFICIALI DI ANALISI PER I FORMAGGI

DISPOSIZIONI GENERALI CONCERNENTI I REATTIVI E L'APPARECCHIATURA DA UTILIZZARE SECONDO I METODI DI ANALISI. DEFINIZIONE DI RIPETIBILITÀ ED ESPRESSIONE DEI RISULTATI

1) Salvo specifiche indicazioni dei metodi di analisi, tutti i reattivi devono essere di purezza analitica (p.a.).

2) Le operazioni di soluzione, diluizione, risciacquo e lavaggio, menzionate nei metodi di analisi senza precisazioni sulla natura del solvente o del diluente, implicano l'impiego di acqua. Di norma l'acqua deve essere distillata o demineralizzata di purezza equivalente. In casi particolari, indicati nei metodi di analisi, essa deve essere sottoposta a procedimenti specifici di purificazione.

3) Tenuto conto dell'abituale equipaggiamento dei laboratori di controllo, l'apparecchiatura descritta nei metodi di analisi si limita agli strumenti ed agli apparecchi speciali o che impongano esigenze specifiche.

4) Per ripetibilità si intende la differenza fra i risultati di 2 determinazioni, effettuate dallo stesso analista, su aliquote diverse dello tesso campione, contemporaneamente od in rapida successione.

5) Il risultato deve essere espresso secondo le indicazioni fornite dai metodi di analisi con un numero appropriato di cifre significative.

6) I metodi di analisi si applicano anche alla ricotta pur non essendo tale prodotto un formaggio.

I) MODALITÀ PER IL PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI DI FORMAGGIO, DI FORMAGGIO FUSO E DI RICOTTA DA SOTTOPORRE AD ANALISI.

1. - *Scopo e campo di applicazione.*

Prelievo e preparazione dei campioni di formaggio, formaggio fuso e ricotta da sottoporre ad analisi.

2. - *Istruzioni generali.*

2.1. - Materiale per il prelievo.

2.1.1. - Le caratteristiche dei materiali da usare nei prelievi sono specificate in relazione al tipo di campione da prelevare ed al tipo di accertamento da eseguire.

2.1.2. - Il materiale ed i contenitori per i campioni devono essere asciutti e puliti.

2.2. - Contenitori per i campioni.

2.2.1. - I contenitori utilizzabili per la conservazione dei campioni possono essere i seguenti:

a) recipienti di materiali impermeabili all'acqua ed ai grassi (vetro, metallo inossidabile, materie plastiche adatte), di forma cilindrica con apertura larga. I recipienti devono essere perfettamente chiudibili, a tenuta di liquido, con i seguenti sistemi di chiusura: tappi in gomma o materia plastica ovvero in metallo o in vetro, muniti nella parte interna di una guarnizione di tenuta. Qualora si usino tappi in gomma la parte che va a contatto con il campione deve essere ricoperta di materiale non assorbente ed inodore (ad esempio materia plastica o paraffina). Il materiale dei contenitori deve, in ogni caso, essere tale da non alterare l'odore, il sapore o la composizione del campione. I sacchetti di materia plastica possono, in mancanza di meglio, sostituire i recipienti di plastica rigida;

b) involucri consistenti in fogli di materiale impermeabile all'acqua ed ai grassi (carta rivestita di film di polietilene, fogli di alluminio) che avvolgono totalmente il campione e che, a loro volta, vengono racchiusi in un sacchetto di carta.

3. - *Prelievo dei campioni*

3.1. - Materiale per il prelievo.

3.1.1. - Sonda da formaggio di forma e dimensioni appropriate al tipo di prodotto da campionare.

3.1.2. - Coltello a punta in acciaio inossidabile.

3.1.3. - Filo da taglio in acciaio inossidabile.

3.1.4. - Spatola in acciaio inossidabile.

3.2. - Tecnica del prelievo.

Effettuare un numero di prelievi sufficiente a dare un campione globale di almeno 1000 g da suddividere in 5 aliquote omogenee (campioni per analisi) di almeno 200 g ciascuna. In funzione della forma, del peso, del tipo, del grado di maturazione e tenore in umidità del campione si utilizzi la tecnica ritenuta più idonea. Per i formaggi a pasta dura o di sufficiente consistenza sono consigliate le seguenti tecniche, come esemplificato nelle figure da 1 a 8:

a) prelievo con coltello;
b) prelievo con sonda;
c) prelievo di una forma intera od unità di vendita.

Il metodo *b)* è generalmente preferibile nel caso di prodotti a pasta dura, di grossa pezzatura o spediti in fusti o recipienti; i metodi *a)* e *c)* in tutti gli altri casi.

3.2.1. - Prelievo con coltello.

Con un coltello a punta praticare due tagli radiali a partire dal centro del prodotto se a base circolare, o paralleli allo scalzo se a base rettangolare.

3.2.2. - Prelievo con sonda.

Secondo il peso e la forma del campione utilizzare una delle seguenti tecniche:

3.2.2.1. - Inserire, una o più volte, la sonda obliquamente in direzione del centro del prodotto da una delle facce piane e da una posizione distante almeno 10 cm dal bordo;

3.2.2.2. - Inserire, una o più volte, la sonda perpendicolarmente ad una delle facce del prodotto per raggiungere la faccia opposta, passando per la parte centrale della forma;

3.2.2.3. - Inserire, una o più volte, la sonda orizzontalmente nello scalzo a uguale distanza fra le due superfici piane verso il centro del prodotto stesso.

3.2.3. - Prelievo di forme intere.

Questo metodo è riservato ai prodotti di piccolo formato o a porzioni confezionate ed impacchettate in piccoli contenitori (unità di vendita); si deve prelevare un numero di porzioni sufficienti ad ottenere un campione globale il cui peso sia di almeno 1000 g.

3.3. - Confezionamento del campione.

Subito dopo il prelievo, il campione globale (tasselli, spicchi, piccole porzioni intere, ecc.) viene suddiviso in 5 aliquote omogenee (campione per analisi) che verranno introdotte negli appositi contenitori. Al fine di ottenere campioni per l'analisi fra loro omogenei o anche solo per agevolare l'introduzione di grossi frammenti nel contenitore, il campione globale può essere ridotto in pezzi più piccoli evitandone lo sbriciolamento.

3.3.1. - L'esecuzione di tutti gli accertamenti analitici è possibile solo se il campione è racchiuso nel contenitore (2.2.1.*a*) di forma e dimensioni adatte.

3.3.2. - Nel caso di prodotti ad alto contenuto in umidità e comunque facilmente deperibili, il campione puo essere confezionato nel contenitore 2.2.1.*b*; questa tecnica prolunga la conservabilità del campione ma limita notevolmente il numero degli accertamenti che possono esser eseguiti e viene consigliata, seguendo le modalità descritte di seguito e dietro esplicito consiglio del Laboratorio di analisi, solo nei casi in cui non sia possibile eseguire conservazione e trasporto del campione.

3.4. - Trasporto del campione.

I campioni devono pervenire in laboratorio entro 24 ore dal prelievo, preferibilmente in recipienti refrigerati e coibentati a temperature non superiori a 10°C. Ove ciò non fosse possibile non bisogna frapporre indugio al trasporto in laboratorio e si deve in ogni caso evitare di esporre durante il tragitto il campione a fonti di calore diretto o indiretto. Per i prodotti facilmente deperibili bisogna assolutamente effettuare il trasporto a temperature tra 0 e 5°C.

3.5. - Conservazione dei campioni in laboratorio.

I campioni in caso di analisi devono essere tenuti in frigorifero ad una temperatura compresa fra 0 e 5°C; la conservazione prolungata è invece assicurata solo dal tempestivo congelamento ad una temperatura inferiore a -10°C. In ogni caso è consigliabile effettuare l'analisi al più presto.

4. - *Selezione e numero dei campioni.*

È molto difficile formulare regole precise in merito alla selezione ed al numero dei campioni. È tuttavia possibile dare delle indicazioni di carattere generale sui criteri da seguire. In casi dubbi o insoliti è opportuno chiedere istruzioni al laboratorio di analisi.

In generale il campione prelevato deve essere rappresentativo di unità di partenza omogenea (stesso tipo di prodotto) che può essere reperita in uno o più contenitori, confezioni o forme. la rappresentatività può, a seconda dei casi, essere ottenuta nei modi indicati di seguito:

4.1. - Nel caso di unità di partenza omogenea costituita da un unico contenitore, confezione o forma, si preleva il quantitativo fissato secondo le modalità indicate al paragrafo 3.

4.2. - Nel caso di unità di partenza omogenea, costituita da vari contenitori, confezioni o forme appartenenti ad uno stesso ciclo di lavorazione, si prelevano quantità parziali dai diversi contenitori, confezioni o forme, scegliendo con criteri di assoluta casualità fino a raggiungere il quantitativo fissato; le quantità parziali vengono riunite e mescolate per formare un unico campione globale.

4.3. - Nel caso di unità di partenza omogenea, costituita da vari contenitori, confezioni o forme che non appartengono ad uno stesso ciclo di lavorazione, come regola generale, si consiglia di prelevare un numero di campioni diversi corrispondente allo 0,5-2% del numero totale delle forme, confezioni o contenitori che costituiscono la partita, comunque mai meno di 2 unità, scelte con criteri di assoluta casualità.

4.4. - Nel caso di unità di partenza non omogenea costituita da vari contenitori, confezioni o forme, bisogna cercare di individuare le parti omogenee della partita e procedere, per ciascuna di esse, come detto sopra. Nel peggiore dei casi ogni contenitore, confezione o forma costituirà una singola unità di campionamento.

5. - *Preparazione del campione per l'analisi.*

5.1. - Prodotti duri e semiduri.

Prima dell'analisi allontanare la crosta, la vernice e lo strato superficiale di muffa del prodotto in modo da ottenere un campione rappresentativo come abitualmente è consumato; sminuzzarlo con un apparecchio adatto (grattugia o macinello elettrico).

5.2. - Prodotti molli.

Omogeneizzare, se necessario, in mortaio di porcellana con prolungato rimescolamento a mezzo pestello.

5.3. - Conservare i prodotti 5.1. e 5.2. fino al momento dell'analisi, da fare in giornata, in recipiente di vetro a tenuta di aria. Se si verifica un ritardo, prendere tutte le precauzioni necessarie per garantire la buona conservazione del campione ed impedire la condensazione dell'acqua sulle pareti interne.

6. - *Verbale di prelevamento, contrassegni di identificazione e destinazione dei campioni.*

Il verbale di prelevamento comprensivo dei contrassegni di identificazione e di destinazione dei campioni dovrà essere redatto secondo quanto previsto dalle vigenti norme.

Bibliografia.

Norma provvisoria FIL-IDF 50 A: 1980.
Decreto del Presidente della Repubblica 26 marzo 1980 n. 327: Regolamento di esecuzione della legge 30 aprile 1962, n. 283.
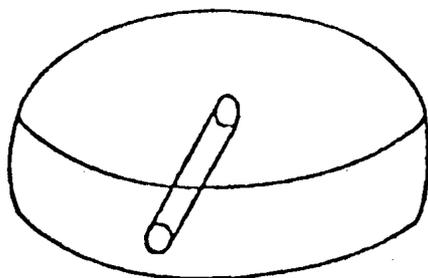
Fig. 1: Campionamento da forma cilindrica per mezzo sonda.
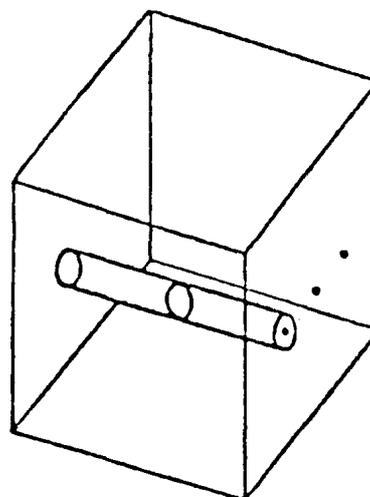
Fig. 2: Campionamento da forma cubica per mezzo sonda.
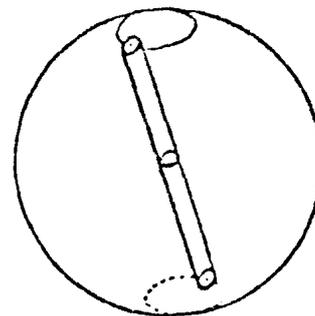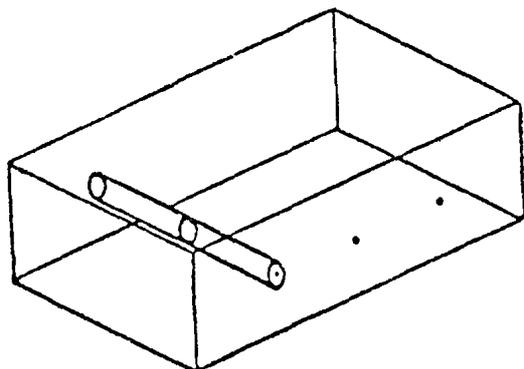
Fig. 3: Campionamento da forma parallelepipeda per mezzo sonda.

Fig. 4: Campionamento da forma sferica con facce inferiori e superiori piane per mezzo sonda.
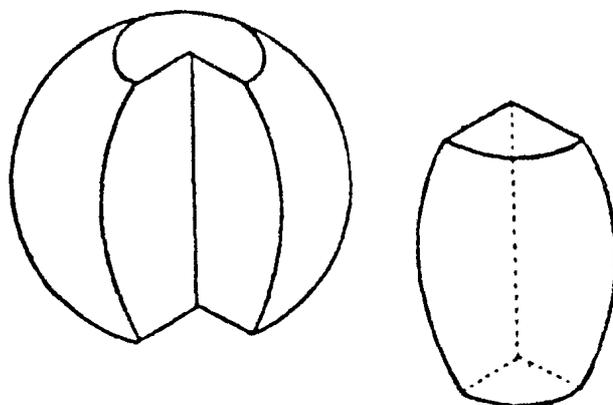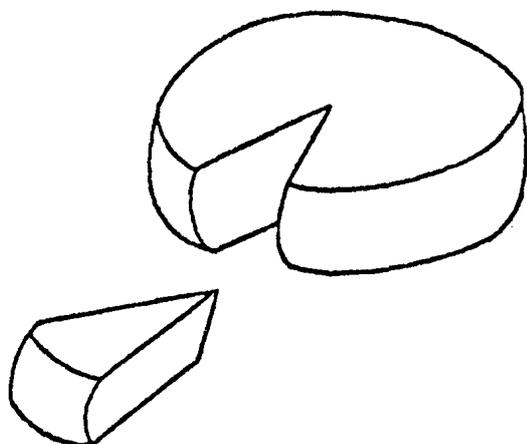
Fig. 5: Campionamento da forma a sezione trasversale circolare e peso superiore a 2,5 kg per taglio a spicchio.

Fig. 6: Campionamento da forma a sezione trasversale circolare e peso superiore a 2,5 kg per taglio a spicchio.
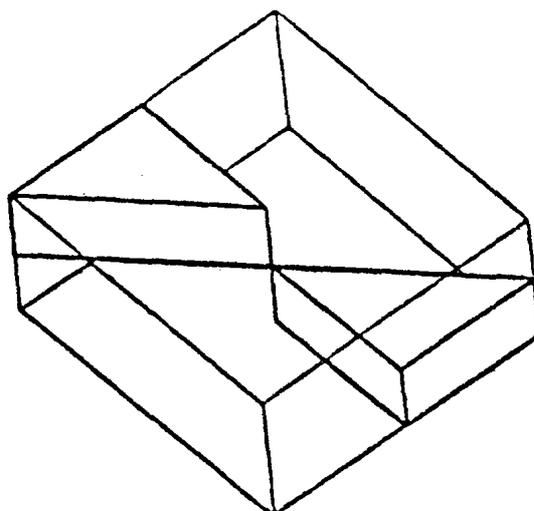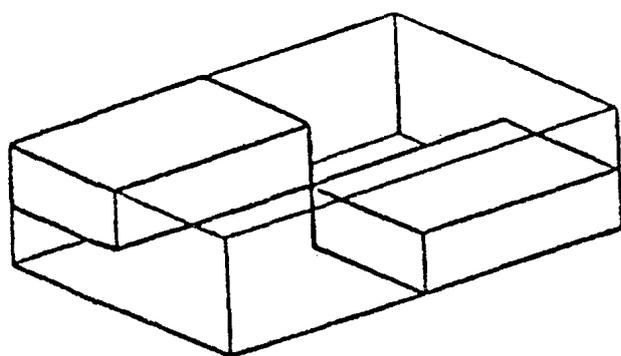
Fig. 7: Campionamento per taglio di spicchio da formaggio a forma parallelepipeda o similare, a facce rettangolari.

Fig. 8: Campionamento per taglio di spicchio da formaggio a forma parallelepipeda a facce grandi e quadrate.

2) DETERMINAZIONE DELLA MATERIA SECCA NEL FORMAGGIO E NEL FORMAGGIO FUSO.

1\. - *Scopo e campo di applicazione.*

Determinazione del tenore in materia secca nel formaggio e nel formaggio fuso.

2\. - *Principio del metodo.*

Il campione viene sottoposto all'essiccamento alla temperatura di 102 ± 1°C in stufa. La materia secca è rappresentata dalla sostanza che rimane dopo l'eliminazione dell'acqua e delle sostanze volatili nelle condizioni operative del metodo.

3\. - *Apparecchiatura.*

3.1. - Capsule in acciaio, nichel od alluminio alte circa 2 cm e con diametro di 6-8 cm.

3.2. - Sabbia di quarzo granulare o marina, opportunamente trattata con acido cloridrico a caldo, successivamente lavata con acqua distillata fino a reazione neutra, essiccata e calcinata a 500-600°C e conservata, dopo raffreddamento, in recipiente chiuso.

4\. - *Campionamento e preparazione.*

Vedi norma n. 1.

5\. - *Procedura.*

5.1. - Porre ad essiccare in stufa a 102 ± 1°C fino a peso costante una capsula contenente circa 20 g di sabbia ed una bacchetta di vetro.

5.2. - Lasciare raffreddare in essiccatore e pesare.

5.3. - Aggiungere rapidamente nella capsula circa 3 g del campione, pesare e mescolare il formaggio con la sabbia aiutandosi con la bacchetta di vetro, porre in stufa a 102°C per 4 ore.

5.4. - Estrarre dalla stufa, porre in essiccatore e lasciare raffreddare, pesare; ripetere l'essiccamento in stufa per 30 minuti fino a peso costante. Qualora si rilevi un incremento finale del peso bisognerà considerare valido il valore della pesata più bassa.

6\. - *Espressione dei risultati.*

6.1. - Calcolo.

$$\text{Tenore percentuale in materia secca} = \frac{M_2 - m}{M_1 - m} \cdot 100$$

dove:

m = peso in g della capsula + sabbia + bacchetta;
M_1 = peso in g della capsula + sabbia + bacchetta + prodotto umido;
M_2 = peso in g della capsula + sabbia + bacchetta + prodotto secco.

6.2. - Ripetibilità.

Inferiore a 0,1 g di materia secca su 100 g di prodotto.

Bibliografia:

Norma FIL-IDF 4: 1958.

3) DETERMINAZIONE DELLA MATERIA SECCA NELLA RICOTTA.

1\. - *Scopo e campo di applicazione.*

Determinazione del tenore in materia secca nella ricotta.

2\. - *Principio del metodo.*

La materisa secca della ricotta è costituita dalle sostanze che rimangono alla fine del processo di essiccazione in stufa a circolazione forzata d'aria alla temperatura di 88 ± 2°C, dopo eliminazione delle sostanze volatili e dell'acqua meno quella di cristallizzazione del lattosio.

3\. - *Apparecchiatura.*

3.1. - Stufa termostatica a circolazione forzata d'aria.

3.2. - Capsule di acciaio, nichel od alluminio alte circa 2 cm e con diametro di 6-8 cm.

3.3. - Sabbia di quarzo granulare o marina, opportunamente trattata con acido cloridrico a caldo, successivamente lavata con acqua distillata fino a razione neutra, essiccata e calcinata a 500-600°C e conservata, dopo raffreddamento in contenitore chiuso.

4. - *Campionamento e preparazione.*

Vedi norma n. 1.

5. - *Procedura.*

5.1. - Porre ad essiccare in stufa a 88 ± 2°C fino a peso costante una capsula contenente circa 20 g di sabbia ed una bacchetta di vetro.

5.2. - Lasciare raffreddare in essiccatore e pesare.

5.3. - Aggiungere rapidamente nella capsula circa 3 g di campione, pesare e mescolare la massa della ricotta con la sabbia aiutandosi con la bacchetta di vetro, porre in stufa a 88 ± 2°C per 4 ore.

5.4. - Estrarre dalla stufa, porre in essiccatore, lasciare raffreddare e pesare; ripetere l'essiccamento per 30' con pesate fino a peso costante. Qualora si rilevi un incremento finale del peso bisognerà considerare valido il valore della pesata più bassa.

6. - *Espressione dei risultati.*

6.1. - Calcolo.

$$\text{Tenore percentuale in materia secca} = \frac{M_2 - m}{M_1 - m} \cdot 100$$

dove:

m = peso in g della capsula + sabbia + bacchetta;
M_1 = peso in g della capsula + sabbia + bacchetta + prodotto umido;
M_2 = peso in g della capsula + sabbia + bacchetta + prodotto secco.

6.2. - Ripetibilità.

Inferiore a 0,2 g di materia secca su 100 g di prodotto.

Bibliografia.

Norma FIL 58: 1970.

4) DETERMINAZIONE DELLA MATERIA GRASSA NEL FORMAGGIO E NEL FORMAGGIO FUSO.

1. - *Scopo e campo di applicazione.*

Determinazione della materia grassa nel formaggio e nel formaggio fuso.

2. - *Principio del metodo.*

Il tenore in materia grassa è determinato gravimetricamente previa idrolisi del prodotto con acido cloridrico addizionato di alcool etilico e successiva estrazione della materia grassa dalla soluzione acida-alcolica con etere etilico ed etere di petrolio, evaporazione dei solventi e pesata del residuo (Schmidt-Bondzynsky-Ratzlaff).

3. - *Reattivi.*

3.1. - Acido cloridrico al 25% p/v (d. 1,125);

3.2. - Alcool etilico al 95% v/v;

3.3. - Etere etilico esente da perossidi:

3.3.1. - Valutazione della presenza di perossidi: addizionare a 10 ml di etere posti in un cilindro chiuso con tappo di vetro, previamente lavato con poco etere, 1 ml di una soluzione acquosa al 10% p/v di ioduro di potassio preparata di fresco; agitare e lasciare riposare per 1 minuto; nei due strati non si deve avere alcuna colorazione gialla;

3.3.2. - Conservazione dell'etere etilico esente da perossidi: l'etere etilico può essere mantenuto esente da perossidi per aggiunta di lamina di zinco previamente immersa per 1 minuto in una soluzione acida diluita di solfato di rame e poi lavata ripetutamente con acqua. Per un litro di etere usare 80 cm^2 di foglio di zinco tagliato in striscie sufficientemente lunghe da interessare almeno metà dell'altezza del contenitore.

3.4. - Etere di petrolio 30-60°C;

3.5. - Miscela in parti eguali di etere etilico (3.3) ed etere di petrolio (3.4) preparata di fresco;

3.6. - Filtri di cellulosa completamente solubili in acido cloridrico.

4 - *Apparecchiatura.*

4.1. - Tubi o flaconi di estrazione appropriati e di capacità non inferiore a 100 ml, muniti di tappi di vetro smerigliato o di materiale inerte ai solventi impiegati.

5. - *Campionamento e preparazione.*

Vedi norma n. 1.

6. - *Procedura.*

6.1. - Prova in bianco.

6.1.1. - Prima della determinazione della materia grassa nel campione, effettuare una prova in bianco su 10 ml di acqua distillata; se il valore della prova in bianco dà una differenza di peso superiore a 0,5 mg controllare i reattivi purificandoli o sostituendoli.

6.2. - Determinazione.

6.2.1. - Essiccare un pallone da 150 ml a fondo piatto contenente alcune palline di vetro in stufa a 102 ± 2°C fino a peso costante;

6.2.2. - Idrolisi.

6.2.2.1. - Pesare esattamente se necessario su filtro di cellulosa (3.6) circa 3 g di campione ed introdurre nel tubo di estrazione (4.1);

6.2.2.2. - Aggiungere 8-10 ml di acido cloridrico (3.1) e riscaldare su bagno maria bollente agitando leggermente fino a completa digestione del prodotto ed eventualmente della cellulosa; lasciare su bagno maria bollente per 20 minuti, raffreddare con acqua corrente;

6.2.2.3. - Aggiungere 10 ml di alcool etilico (3.2), mescolare dolcemente ed accuratamente.

6.2.3. - Estrazione.

6.2.3.1. - Aggiungere 25 ml di etere etilico (3.3), chiudere l'apparecchio con tappo di sughero, capovolgere a più riprese per 1 minuto, raffreddando se necessario;

6.2.3.2. - Togliere il tappo con precauzione, aggiungere 25 ml di etere di petrolio (3.4), utilizzando i primi ml per lavare il tappo e l'interno del collo e lasciare sgocciolare il liquido di lavaggio dentro l'apparecchio; chiudere col tappo ed agitare rovesciando a più riprese per 30 secondi;

6.2.3.3. - Lasciare l'apparecchio a riposo fino a che lo strato superiore diventi limpido e si separi nettamente dalla fase acquosa;

6.2.3.4. - Togliere il tappo, lavarlo, così come il collo dell'apparecchio con alcuni ml della miscela (3.5) lasciando scolare nell'apparecchio i liquidi di lavaggio; travasare con cura per decantazione ed il più rapidamente possibile lo strato superiore nel pallone (6.2.1);

6.2.3.5. - Lavare l'interno e l'esterno del collo dell'apparecchio con qualche ml di miscela (3.5) lasciare scolare nel pallone i liquidi del lavaggio esterno ed interno dell'apparecchio;

6.2.3.6. - Procedere ad una seconda estrazione ripetendo le operazioni descritte al (6.2.3) utilizzando 15 ml di etere etilico e 15 di etere di petrolio;

6.2.3.7. - Procedere ad una terza estrazione ripetendo le operazioni del (6.2.3) evitando il lavaggio finale;

6.2.3.8. - Allontanare i solventi per evaporazione o distillazione;

6.2.3.9. - Porre il pallone contenente l'estratto lipidico in stufa per 60 minuti a 102 ± 2°C; togliere il pallone dalla stufa, raffreddare in essiccatore e pesare;

6.2.3.10. - Ripetere l'operazione (6.2.3.9) fino a peso costante.

6.2.4. - Controllo della purezza dell'estratto.

6.2.4.1. - Versare nel pallone 20 ml di etere di petrolio, scaldare leggermente ed agitare con movimento rotatorio fino a che la materia grassa sia passata in soluzione;

6.2.4.2. - Se la materia estratta è perfettamente solubile in etere di petrolio il peso della materia grassa è dato dalla differenza fra la pesata al (6.2.3.10) e quella al (6.2.1);

6.2.4.3. - In caso contrario estrarre completamente la materia grassa contenuta nel pallone con ripetuti lavaggi a mezzo etere di petrolio caldo, lasciando depositare le materie non disciolte prima di ogni decantazione; lavare tre volte l'esterno del collo del pallone, scaldare il pallone inclinato nella stufa per un'ora, raffreddare in essiccatore e pesare;

6.2.4.4. - Il peso della materia grassa è la differenza fra il peso ottenuto al (6.2.3.10) e quello al (6.2.4.3).

7. - *Espressione dei risultati.*

7.1. - Calcolo.

Tenore in materia grassa del campione, espresso in g % $= \frac{(M_1 - M_2) - (B_1 - B_2)}{p} 100$

dove:

M_1 = peso in g del pallone contenente la materia grassa (6.2.3.10);
M_2 = peso in g del pallone vuoto (6.2.1) o nel caso siano presenti materie insolubili, peso in g del pallone (6.2.4.3);
B_1 = peso in g del pallone prova in bianco (6.1.1);
B_2 = peso in g del pallone vuoto relativo alla proceduta della prova in bianco (6.1.1) o, nel caso siano presenti nella prova in bianco materie insolubili, peso in g del pallone (6.2.4.3);
p = peso in g del campione di partenza.

7.2. - Ripetibilità.

Inferiore a 0,2 g di grasso su 100 g di prodotto.

Bibliografia.

Norma FIL-IDF 5A : 1969.

5) DETERMINAZIONE DELLA MATERIA GRASSA NELLA RICOTTA.

1. - *Scopo e campo di applicazione.*

Determinazione del tenore in materia grassa nella ricotta.

2. - *Principio del metodo.*

Il tenore in materia grassa è determinato gravimetricamente, previa estrazione della stessa con etere etilico ed etere di petrolio da una soluzione ammoniacale di ricotta, evaporazione dei solventi e pesata del residuo (s. Röse-Gottlieb).

3. - *Reattivi.*

3.1. - Soluzione di ammoniaca al 25% p/v (d. 0,91 circa);

3.2. - Alcool etilico al 95% v/v;

3.3. - Etere etilico esente da perossidi:

3.3.1. - Valutazione della presenza di perossidi: addizionare a 10 ml di etere posti in un cilindro chiuso con tappo di vetro, previamente lavato con poco etere, 1 ml di una soluzione al 10% p/v di ioduro di potassio preparata di fresco, agitare e lasciar riposare per 1 minuto; nei due strati non si deve avere alcuna colorazione gialla;

3.3.2. - Conservazione dell'etere etilico esente da perossidi: l'etere etilico può essere mantenuto esente da perossidi per aggiunta di lamina di zinco previamente immersa per 1 minuto in una soluzione diluita acida di solfato di rame e poi lavata ripetutamente con acqua; per un litro di etere usare 80 cm^2 di foglio di zinco tagliato in striscie sufficientemente lunghe da interessare almeno la metà dell'altezza del contenitore.

3.4. - Etere di petrolio 30-60°C;

3.5. - Miscela in parti eguali di etere etilico (3.3) ed etere di petrolio (3.4) preparata di fresco.

4. — *Apparecchiatura.*

4.1. - Tubi o flaconi di estrazione appropriati (tipo Mojonnier) e di capacità non inferiore a 100 ml muniti di tappi di sughero.

5. - *Campionamento e preparazione.*

Vedi norma n. 1.

6. - *Procedura.*

6.1. - Prova in bianco.

6.1.1. - Prima della determinazione della materia grassa nel campione, effettuare una prova in bianco su 10 ml di acqua distillata; se il valore della prova in bianco dà una differenza di peso superiore a 0,5 mg controllare i reattivi purificandoli o sostituendoli.

6.2. - Determinazione.

6.2.1. - Essiccare un pallone da 150 ml a fondo piatto contenente alcune palline di vetro in stufa a 102 ± 2°C fino a peso costante.

6.2.2. - Solubilizzazione del prodotto.

6.2.2.1. - Porre 3 g circa di ricotta esattamente pesata nel tubo di estrazione, aggiungere 10 ml di acqua distillata e scaldare su bagno maria bollente agitando dolcemente fino a completa dispersione della ricotta; lasciare su bagno maria in riposo per 20 minuti;

6.2.2.2. - Aggiungere 2 ml della soluzione di ammoniaca (3.1), mescolare accuratamente e raffreddare con acqua corrente;

6.2.2.3. - Aggiungere 10 ml di alcool etilico (3.2) e mescolare i liquidi agitando cautamente ma accuratamente il contenuto dell'apparecchio di estrazione mantenuto aperto.

6.2.3. - Estrazione.

6.2.3.1. - Aggiungere 25 ml di etere etilico (3.3), chiudere con tappo di sughero agitare energicamente capovolgendo più volte per 1 minuto;

6.2.3.2. - Togliere con precauzione il tappo ed aggiungere 25 ml di etere di petrolio (3.4) impiegando i primi ml per il lavaggio del tappo e dell'interno del collo dell'apparecchio; mettere il tappo, agitare e capovolgere più volte per 30 secondi;

6.2.3.3. - Lasciare l'apparecchio in riposo fino a che lo strato superiore diventi limpido e si separi nettamente dalla fase acquosa;

6.2.3.4. - Togliere il tappo, lavarlo, così come il collo dell'apparecchio, con alcuni ml della miscela solvente (3.5) lasciare scolare nell'apparecchio il liquido di lavaggio, travasare per decantazione con cura e rapidamente lo strato superiore nel pallone (6.2.1);

6.2.3.5. - Rilavare l'esterno e l'interno del collo dell'apparecchio con qualche ml di solvente (3.5) lasciare scolare nel pallone i liquidi di lavaggio interno ed esterno dell'apparecchio;

6.2.3.6. - Procedere ad una seconda estrazione ripetendo le operazioni descritte al (6.2.3) utilizzando 15 ml di etere etilico e 15 ml di etere di petrolio;

6.2.3.7. - Procedere ad una terza estrazione ripetendo le operazioni del (6.2.3) evitando il lavaggio finale;

6.2.3.8. - Allontanare i solventi per evaporazione o distillazione;

6.2.3.9. - Porre il pallone contenente l'estratto lipidico in stufa per 60 minuti a 102 $\pm$ 2°C; togliere il pallone dalla stufa, raffreddare in essiccatore e pesare;

6.2.3.10. - Ripetere l'operazione (6.2.3.9) fino a peso costante.

6.2.4. - Controllo della purezza dell'estratto.

6.2.4.1. - Versare nel pallone 20 ml di etere di petrolio, scaldare leggermente ed agitare con movimento rotatorio fino a che la materia grassa sia passata in soluzione;

6.2.4.2. - Se la materia estratta è perfettamente solubile in etere di petrolio il peso della materia grassa è dato dalla differenza fra la pesata (6.2.3.10) e quello al (6.2.1);

6.2.4.3. - In caso contrario, estrarre completamente la materia grassa contenuta nel pallone con ripetuti lavaggi a mezzo etere di petrolio caldo, lasciando depositare le materie non disciolte prima di ogni decantazione, lavare 3 volte l'esterno del collo del pallone, scaldare il pallone inclinato per un'ora in stufa, raffreddare in essiccatore e pesare;

6.2.4.4. - Il peso della materia grassa è dato dalla differenza fra il peso al (6.2.3.10) e quello al (6.2.4.3).

7. - *Espressione dei risultati.*

7.1. - Calcolo.

Tenore in materia grassa del campione espresso in g % = $\frac{(M_1 - M_2) - (B_1 - B_2)}{p} \cdot 100$

dove:

M_1 = peso in g del pallone contenente la materia grassa (6.2.3.10);
M_2 = peso in g del pallone vuoto (6.2.1) o nel caso siano presenti materie insolubili, peso in g del pallone (6.2.4.3);
B_1 = peso in g del pallone prova in bianco (6.1.1);
B_2 = peso in g del pallone vuoto relativo alla proceduta della prova in bianco (6.1.1) o, nel caso siano presenti nella prova in bianco materie insolubili peso del pallone (6.2.4.3);
p = peso in g del campione di partenza.

7.2. - Ripetibilità.

Inferiore a 0,2 g di grasso su 100 g di prodotto.

Bibliografia.

Norma FIL-IDF 59 : 1970.

6) DETERMINAZIONE DELLE SOSTANZE AZOTATE TOTALI NEL FORMAGGIO, NEL FORMAGGIO FUSO E NELLA RICOTTA.

1. - *Scopo e campo di applicazione.*

Determinazione del tenore in sostanze azotate totali nel formaggio, nel formaggio fuso e nella ricotta.

2. - *Principio del metodo.*

Il tenore in sostanze azotate totali è calcolato in base alla determinazione dell'azoto totale secondo Kjeldahl moltiplicato per il fattore 6,38.

3. - *Reattivi.*

3.1. - Miscela fosfo-solforica: sciogliere 250 g di anidride fosforica in un litro di acido solforico concentrato (d = 1,84);

3.2. - Ossido rameico in polvere;

3.3. - Soluzione di idrossido di sodio al 30% circa p/v;

3.4. - Soluzione di acido borico: sciogliere 40 g di acido borico in un litro di acqua;

3.5. - Acido cloridrico 0,1N;

3.6. - Indicatore: 2 g di rosso di metile e 1 g di blu di metilene in 1 litro di etanolo al 96% v/v;

3.7. - Olio di paraffina.

4. - *Apparecchiatura.*

4.1. - Apparecchiatura secondo Kjeldahl per la mineralizzazione e la distillazione dell'azoto.

5. - *Campionamento e preparazione.*

Vedi norma n. 1.

6. - *Procedura.*

6.1. - Introdurre in un pallone Kjeldahl da 500-800 ml circa 1 g di campione esattamente pesato, addizionando 2 g circa di ossido rameico (3.2), 25 ml della miscela fosfo-solforica (3.1) e qualche ml di olio di paraffina (3.7);

6.2. - Porre il pallone su un fornello di ossidazione in posizione inclinata e riscaldare cautamente fino a che cessa lo schiumeggiamento; mantenere a vivace ebollizione finché ogni traccia di sostanza carboniosa sia scomparsa e il liquido diventi limpido; continuare l'ebollizione per altri 30 minuti circa evitando ogni surriscaldamento locale;

6.3. - Dopo raffreddamento a temperatura ambiente aggiungere cautamente circa 200 ml di acqua e qualche granulo di pietra pomice; agitare dolcemente e lasciar raffreddare di nuovo;

6.4. - Porre in beuta da 500 ml 50 ml della soluzione di acido borico (3.4) ed alcune gocce di indicatore (3.6);

6.5. - Collegare il pallone Kjeldahl al refrigerante e sistemare la beuta sotto il refrigerante in modo che l'estremità del tubo di uscita collegato al medesimo sia immersa nella soluzione di acido borico;

6.6. - Versare nel pallone Kjeldahl, contenente l'azoto mineralizzato, la soluzione di idrossido di sodio (3.3) fino a reazione nettamente alcalina, riconoscibile dal totale cambiamento di colore;

6.7. - Riscaldare all'ebollizione evitando la formazione di schiuma; continuare l'operazione finché tutta l'ammoniaca è distillata;

6.8. - Prima di interrompere il riscaldamento abbassare la beuta in posizione tale che il tubo non peschi più nella soluzione;

6.9. - Interrompere il riscaldamento, lavare con acqua il tubo di uscita raccogliendo le acque di lavaggio in beuta;

6.10. - Titolare il distillato con acido cloridrico (3.5);

6.11. - Prova in bianco: effettuare una prova in bianco, ogni volta che si utilizzano nuovi reattivi, seguendo la stessa procedura e tenendo conto nel calcolo finale dell'eventuale contenuto di azoto presente nei reattivi.

7. - *Espressione dei risultati.*

7.1. - Calcolo.

Tenore in azoto totale del campione, espresso in g per 100 g di prodotto $= \frac{0{,}14\ (V1 - V2)}{p}$

dove:

$V1$ = ml di soluzione di acido cloridrico impiegati nella titolazione;
$V2$ = ml di soluzione di acido cloridrico impiegati nella titolazione della prova in bianco;
p = peso in g del campione.

Il tenore in sostanze azotate viene calcolato moltiplicando il contenuto di azoto totale × 6,38.

7.2. - Ripetibilità.

Inferiore a 0,5 g di proteina totale su 100 g di prodotto.

Bibliografia.

Norma FIL-IDF 25 : 1964.

7) DETERMINAZIONE DELLE SOSTANZE AZOTATE SOLUBILI IN CITRATO DI SODIO A pH 4,6 NEL FORMAGGIO, NEL FORMAGGIO FUSO E NELLA RICOTTA.

1. - *Scopo e campo di applicazione.*

Determinazione del tenore in sostanze azotate solubili in citrato di sodio a pH 4,6 nel formaggio, nel formaggio fuso e nella ricotta.

2. - *Principio del metodo.*

Il prodotto viene trattato con soluzione di citrato di sodio ed omogeneizzato; la soluzione è poi portata a pH 4,6 al fine di precipitare la caseina e sul surnatante, separato per centrifugazione e filtrazione, viene dosato l'azoto secondo Kjeldahl.

3. - *Reattivi.*

3.1. - Soluzione di citrato di sodio tribasico biidrato 0,5M (g 147,05/litro);

3.2. - Soluzione di acido cloridrico 1N circa;

3.3. - Tutti i reattivi della Norma n. 6/punto 3.

4. - *Apparecchiatura.*

4.1. - Omogeneizzatore elettrico ad alta velocità;

4.2 - Tutta l'apparecchiatura della Norma n. 6/punto 4.

4.3 - pH metro

5. - *Campionamento e preparazione.*

Vedi norma n. 1.

6. - *Procedura.*

6.1. - Pesare esattamente circa 10 g di campione in beker da 400 ml, aggiungervi 40 ml di soluzione di citrato di sodio (2.1) e 60 ml di acqua; omogeneizzare ad alta velocità per 5 minuti;

6.2. - Portare la soluzione al pH metro aggiustando sotto agitazione il pH a 4,6 con acido cloridrico 1N prima e poi 0,1N; trasferire quantitativamente in pallone da 250 ml e portare a volume con acqua. Lasciar riposare per 15 minuti;

6.3. - Centrifugare a 6000 giri per 10 minuti alla temperatura di 5° C, filtrare il surnatante su filtro a filtrazione rapida;

6.4. - Prelevare con pipetta 25 ml di filtrato e porre in pallone di attacco Kjeldahl procedendo come per le sostanze azotate totali (Norma n. 6/punto 6);

6.5. - Con le stesse modalità effettuare una prova in bianco a partire dal punto (6.1).

7. - *Espressione dei risultati.*

7.1. Calcolo.

Tenore in azoto a pH 4,6 in g per 100 g di prodotto $= \frac{0{,}14\ (V1 - V2)}{p}$

dove:

V1 = ml di soluzione di acido cloridrico impiegati per la titolazione del campione;
V2 = ml di soluzione di acido cloridrico impiegati per la titolazione della prova in bianco;
p = peso dell'aliquota del campione sottoposta a distillazione.

Il tenore in sostanze azotate viene calcolato moltiplicando il contenuto in azoto solubile a pH 4,6 × 6,38.

7.2. - Ripetibilità.

Inferiore a 0,5 g di proteine solubili a pH 4,6 su 100 g di prodotto.

Bibliografia.

MOGENSEN M.T.S.: *Medd. Statens Mejeriforsok*, n. 21, 1948.
Norma FIL-IDF 25 : 1964.

8) DETERMINAZIONE DELLE SOSTANZE AZOTATE SOLUBILI IN ACQUA NEL FORMAGGIO, NEL FORMAGGIO FUSO E NELLA RICOTTA.

1. - *Scopo e campo di applicazione.*

Determinazione del tenore in sostanze azotate solubili in acqua nel formaggio, nel formaggio fuso e nella ricotta.

2. - *Principio del metodo.*

Il prodotto viene spappolato in acqua e filtrato dopo circa 12 ore di riposo; sul filtrato viene dosato l'azoto solubile secondo Kjeldahl.

3. - *Reattivi.*

3.1. - Soluzione acquosa di formaldeide a circa 40% v/v;

3.2. - Tutti i reattivi della Norma n. 6/punto 3.

4. - *Apparecchiatura.*

4.1. - Tutta l'apparecchiatura della Norma n. 6/punto 4.

5. - *Campionamento e preparazione.*

Vedi norma n. 1.

6. - *Procedura.*

6.1. - Pesare esattamente 4 g circa di campione in beker da 100 ml, aggiungere poco alla volta acqua riscaldata a circa 40° C spappolando accuratamente; trasferire quantitativamente in matraccio da 100 ml, raffreddare e portare a volume con acqua; aggiungere alcune gocce di formaldeide, agitare bene e porre in frigorifero per una notte;

6.2. - Filtrare su filtro asciutto a filtrazione rapida; prelevare con pipetta 20 ml del filtrato e porre in pallone d'attacco Kjeldahl, procedendo come per le sostanze azotate totali (Norma n. 6/punto 6);

6.3. - Effettuare con le stesse modalità una prova in bianco a partire dal punto (6.1).

7. - *Espressione dei risultati.*

7.1. - Calcolo.

$$\text{Tenore in azoto solubile in acqua in g per 100 g di prodotto} = \frac{0{,}14\ (V1 - V2)}{p}$$

dove:

V1 = ml di soluzione di acido cloridrico impiegati per la titolazione del campione;
V2 = ml di soluzione di acido cloridrico impiegati per la titolazione della prova in bianco;
p = peso dell'aliquota del campione sottoposto a distillazione.

Il tenore in sostanze azotate viene calcolato moltiplicando il contenuto in azoto solubile in acqua × 6,38.

7.2. - Ripetibilità.

Inferiore allo 0,2 g di proteine solubili in acqua su 100 g di prodotto.

Bibliografia.

SAVINI E.: *Analisi del latte e dei latticini.* Ed. Hoepli 1946 (pag. 854).

9) DETERMINAZIONE DEL LATTOSIO NEL FORMAGGIO, NEL FORMAGGIO FUSO E NELLA RICOTTA.

1. - *Scopo e campo di applicazione.*

Determinazione del tenore in lattosio nel formaggio, nel formaggio fuso e nella ricotta che non contengano altre sostanze riducenti.

2. - *Principio del metodo.*

Un'aliquota di filtrato limpido, preparato per dispersione del campione in acqua e successiva defecazione col reattivo di Carrez viene portata all'ebollizione in presenza di una soluzione di ione rameico; per l'azione riduttrice del lattosio si forma un precipitato di ione rameoso (ossidulo di rame) mentre l'eccesso di ione rameico viene dosato per via iodometrica.

3. - *Reattivi.*

3.1. - Reattivo di Carrez

3.1.1. - Soluzione di Carrez 1: sciogliere 21,95 g di acetato di zinco biidrato e 3 ml di acido acetico glaciale e portare a 100 ml con acqua;

3.1.2. - Soluzione di Carrez 2: sciogliere 10,6 g di ferrocianuro di potassio triidrato e portare a 100 ml con acqua.

3.2. - Reattivo di Luff-Schoorl:

3.2.1. - Soluzione di solfato di rame: sciogliere 25 g di solfato di rame pentaidrato, esente da ferro e portare a 100 ml con acqua;

3.2.2. - Soluzione di acido citrico: sciogliere 50 g di acido citrico monoidrato in 50 ml di acqua;

3.2.3. - Soluzione di carbonato di sodio: sciogliere 143,8 g di carbonato anidro di sodio in circa 300 ml di acqua calda e lasciar raffreddare;

3.2.4. - Versare, agitando prudentemente, la soluzione (3.2.3) nella soluzione (3.2.2) ed agitare fino a scomparsa dello sviluppo gassoso. Aggiungere quindi la soluzione (3.2.1) e portare con acqua al volume di 1 litro; lasciar riposare una notte e filtrare se necessario. Controllare secondo (6.1) la molarità del reattivo ottenuto.

3.3. - Tiosolfato di sodio 0,1 N;

3.4. - Soluzione di amido: pesare in beker 5 g di amido solubile, disperdere con 30 ml di acqua, aggiungere circa un litro di acqua bollente, far bollire per 3 minuti e poi raffreddare. Aggiungere eventualmente 10 mg di ioduro di mercurio come agente conservante;

3.5. - Soluzione di acido solforico 3M circa (160 ml di acido solforico d = 1,84 a un litro con acqua);

3.6. - Soluzione di ioduro di potassio al 30% p/v;

3.7. - Granelli di pietra pomice bolliti in acido cloridrico, lavati con acqua fino a scomparsa dell'acidità ed essiccati in stufa;

3.8. - Idrossido di sodio 0,1 N;

3.10. - Acido cloridrico 0,1 N;

3.11. - Soluzione di fenolftaleina all'1% p/v in etanolo al 95% v/v.

4. - *Apparecchiatura.*

4.1. - Mortaio di porcellana da 300 ml circa e relativo pestello;

4.2. - Pallone con collo smerigliato da 300 ml provvisto di refrigerante a riflusso;

4.3. - Reticella metallica con schermo di amianto in cui è praticato un foro corrispondente al diametro del fondo del pallone (4.2).

5. - *Campionamento e preparazione.*

Vedi norma n. 1.

6. - *Procedura.*

6.1. - Controllo del reattivo di Luff-Schoorl.

6.1.1. - Aggiungere a 25 ml di reattivo di Luff-Schoorl (3.2), pipettati in beuta da 300 ml, 3 g di ioduro di potassio e 25 ml di acido solforico (3.5); titolare con tiosolfato sodico 0, 1N (3.3) in presenza della soluzione di amido (3.4). La quantità di tiosolfato sodico utilizzata deve essere pari a 25 ml;

6.1.2. - Pipettare 10 ml del reattivo Luff-Schoorl in un pallone tarato da 100 ml e portare a segno con acqua; mescolare in una beuta 10 ml di questo reattivo diluito con 25 ml di acido cloridrico 0,1N (3.10) e riscaldare per un'ora su bagno maria bollente. Raffreddare, riportare al volume iniziale con acqua recentemente bollita e titolare con idrossido di sodio 0,1N (3.9) in presenza di fenolftaleina (3.11). La quantità di idrossido di sodio 0,1N utilizzata deve essere compresa fra 5,5 e 6,5 ml;

6.1.3. - Titolare con acido cloridrico (3.10) in presenza di fenolftaleina 10 ml del reattivo Luff-Schoorl diluito come in (6.1.2); la quantità di acido cloridrico utilizzata deve essere compresa fra 6 e 7,5 ml;

6.1.4. - Il pH del reattivo deve essere compreso fra 9,3 e 9,4 a 20° C.

6.2. - Determinazione.

6.2.1. - Porre 10 g del campione esattamente pesati nel mortaio di porcellana e spappolare con il pestello aggiungendo piccole quantità di acqua calda (60-70° C); travasare in pallone tarato da 500 ml e diluire fino a circa 400 ml; aggiungere 5 ml della soluzione di Carrez 1 (3.1.1) e mescolare prudentemente, il pallone mantenuto leggermente inclinato. Aggiungere nello stesso modo 5 ml della soluzione di Carrez 2 (3.1.2), raffreddare sotto acqua a circa 20° C e portare a segno con acqua; mescolare intimamente con vigorosa agitazione e filtrare sul filtro a pieghe asciutto scartando i primi ml di filtrato.

6.2.2. - Introdurre nel pallone (4.2) 25 ml del reattivo di Luff-Schoorl misurati esattamente, aggiungere 2 granelli di pietra pomice e 25 ml del filtrato (6.2.1); collegare il pallone con refrigerante a riflusso e portare il liquido all'ebollizione in due minuti circa ponendo il pallone sulla reticella metallica (4.3); far bollire dolcemente per 10 minuti esatti, raffreddare rapidamente in acqua fredda, aggiungere nel pallone 10 ml di soluzione di ioduro di potassio (3.6) e subito dopo con cautela (a causa della formazione di abbondante schiuma) 25 ml di acido solforico (3.5); titolare con tiosolfato di sodio 0,1N fino a colorazione giallo pallida; aggiungere allora 5 ml della soluzione di amido (3.4) e proseguire la titolazione fino a scomparsa della colorazione blu.

6.2.3. - Effettuare una prova in bianco usando 25 ml di acqua al posto dei 25 ml della soluzione in esame e procedere come indicato al punto 6.2.

7. - *Espressione dei risultati.*

7.1. - Calcolo.

Ricavare dall'allegata tabella la quantità in mg di lattosio anidro o idrato corrispondente alla differenza tra i valori delle due titolazioni, effettuando, se necessario, l'interpolazione.

Tenore espresso in g di lattosio anidro o idrato contenuto in 100 g di campione =

$$\frac{A \times 50.000}{V \cdot p} \cdot 0{,}99 = \frac{A \times 500}{V \cdot p} \cdot 99$$

dove:

A = peso del lattosio anidro o idrato ricavato dalla tabella ed espresso in grammi;
V = volume del filtrato in esame (6.2.1) espresso in ml;
p = peso in g del campione di analisi;
0,99 = fattore di correzione per compensare l'errore di volume dovuto alla presenza di materia grassa e di proteina.

7.2. - Ripetibilità.

Inferiore a 0,15 g di lattosio anidro su 100 g di prodotto.

8. - *Osservazioni.*

8.1. - La differenza tra i ml di soluzione di tiosolfato di sodio 0,1N impiegati pe la prova in bianco e quelli impiegati per la titolazione del filtrato deve rientrare nei valori riportati in tabella. in caso contrario la soluzione da titolare deve essere opportunamente diluita.

8.2. - È raccomandabile aggiungere, prima dell'acidificazione con acido solforico 3M circa 1ml di isopentanolo in modo da evitare la formazione di schiuma.

Bibliografia.

Direttiva C.E.E. (79/796/CEE) del 26 luglio 1979 pubblicata nella Gazzetta Ufficiale CEE n. L. 239/24 del 22 settembre 1979.
Norma FIL-IDF 43 : 1967.

TABELLA di conversione dei ml di tiosolfato di Na 0,1 N in lattosio, per 25 ml di reattivo di Luff-Schoorl, a 2 minuti di riscaldamento e 10 minuti di ebollizione.

$Na_2S_2O_3$ 0,1 N	Lattosio anidro		Lattosio idrato		$Na_2S_2O_3$ 0,1 N	Lattosio anidro		Lattosio idrato	
ml	mg	differenza	mg	differenza	ml	mg	differenza	mg	differenza
1	3,6		3,8		13	48,4	3,8	50,9	4,0
2	7,3	3,7	7,7	3,9	14	52,2	3,8	54,9	4,0
3	11,0	3,7	11,6	3,9	15	56,0	3,9	58,9	4,0
4	14,7	3,7	15,5	3,9	16	59,9	3,9	63,0	4,1
5	18,4	3,7	19,4	3,9	17	63,8	3,9	67,1	4,1
6	22,1	3,7	23,3	3,9	18	67,7	4,0	71,3	4,2
7	25,8	3,7	27,2	3,9	19	71,7	4,0	75,5	4,2
8	29,5	3,7	31,1	3,9	20	75,7	4,1	79,7	4,2
9	33,2	3,8	35,0	3,9	21	79,8	4,1	84,0	4,3
10	37,0	3,8	38,9	4,0	22	83,9	4,1	88,3	4,3
11	40,8	3,8	42,9	4,0	23	88,0	4,1	92,6	4,3
12	44,6	3,8	46,9	4,0					

10) DETERMINAZIONE DELLE CENERI NEL FORMAGGIO, NEL FORMAGGIO FUSO E NELLA RICOTTA.

1. - *Scopo e campo di applicazione.*

Determinazione del tenore in ceneri nel formaggio, nel formaggio fuso e nella ricotta.

2. - *Principio del metodo.*

Il campione viene essiccato, carbonizzato e calcinato in muffola a 525 ± 25°C, il peso ottenuto dopo la calcinazione rappresenta il contenuto in ceneri.

3. - *Apparecchiatura.*

3.1. - Capsula di platino o quarzo di 5 cm di diametro e 2,5 cm di altezza.

4. — *Campionamento e preparazione.*

Vedi norma n. 1.

5. - *Procedura.*

5.1. - Porre la capsula in muffola a 525 ± 25°C per 30 minuti, estrarla, lasciarla raffreddare in essiccatore e pesare;

5.2. - Pesare esattamente da 2 a 2,5 g di campione nella capsula, porre in stufa a 105°C per circa 4 ore, poi coprire la capsula con carta da filtro del suo stesso diametro ed esente da ceneri, carbonizzare a becco Bunsen, lasciar bruciare il grasso e introdurre in muffola riportata a 525 ± 25°C lasciandovela fino a ceneri bianche;

5.3. - Estrarre dalla muffola, far raffreddare in essiccatore e pesare; ripetere la calcinazione per 15 minuti e la pesata fino a peso costante.

6. - *Espressione dei risultati.*

6.1. - Calcolo.

$$\text{Tenore percentuale in ceneri} = \frac{M_2 - m}{M_1 - m} \cdot 100$$

dove:

m = peso in g della capsula;
M_1 = peso in g della capsula + campione;
M_2 = peso in g della capsula + ceneri;

6.2. - Ripetibilità.

Inferiore a 0,15 g di ceneri su 100 g di prodotto.

Bibliografia.

Norma FIL-IDF 27 : 1964.

11) DETERMINAZIONE DELL'ALCANILITÀ DELLE CENERI NEL FORMAGGIO, NEL FORMAGGIO FUSO E NELLA RICOTTA.

1. - *Scopo e campo di applicazione.*

Determinazione del tenore in alcalinità delle ceneri nel formaggio, nel formaggio fuso e nella ricotta.

2. - *Principio del metodo.*

Le ceneri vengono solubilizzate a caldo con una quantità nota di acido cloridrico 0,1N il cui eccesso viene poi titolato con idrossido di sodio 0,1N in presenza di fenolftaleina, previa aggiunta di una soluzione satura di cloruro di calcio.

3. - *Reattivi.*

3.1. - Soluzione di cloruro di calcio al 40% p/v neutralizzata con acido cloridrico 0,1N o con idrossido di sodio 0,1N usando la fenolftaleina come indicatore, e filtrata appena prima dell'uso;

3.2. - Acido cloridrico 0,1N;

3.3. - Idrossido di sodio 0,1N;

3.4. - Soluzione di fenolftaleina all'1% p/v in etanolo al 95% v/v.

4. - *Apparecchiatura.*

Come prevista alla norma n. 10.

5. - *Procedura.*

5.1. - Trasferire quantitativamente, utilizzando 50 ml di acido cloridrico 0,1N (3.2) le ceneri già pesate (norma n. 10 / punto 5.3) in matraccio da 300 ml lavando ripetutamente la capsula con acqua; tenere il matraccio su bagnomaria bollente fino a solubilizzazione delle ceneri, raffreddare, aggiungere 10 gocce di fenolftaleina, 30 ml di cloruro di calcio (3.1) e titolare l'eccesso di acido con idrossido di sodio 0,1N (3.3).

6. - *Espressione dei risultati.*

6.1. - Calcolo.

Tenere in alcalinità delle ceneri espresso in g di carbonato di potassio per 100 g di ceneri;

$$\frac{(M - M_1) \cdot 0{,}691}{p}$$

dove:

M = ml di soluzione 0,1N di acido cloridrico;
M_1 = ml di soluzione 0,1N di idrossido di sodio;
p = peso in g del campione iniziale (ceneri);
0,691 = fattore di conversione per esprimere il dato in g di carbonato di potassio per 100 g di ceneri.

6.2. - Ripetibilità.

Inferiore a 0,2 ml di idrossido di sodio 0,1N nella titolazione finale.

Bibliografia.

Methods of Analisys of A.O.A.C., 1975 pg. 277.

12) DETERMINAZIONE DEL CALCIO TOTALE NEL FORMAGGIO, NEL FORMAGGIO FUSO E NELLA RICOTTA.

1. - *Scopo e campo di applicazione.*

Determinazione del tenore in calcio totale nel formaggio, nel formaggio fuso e nella ricotta.

2. - *Principio del metodo.*

Le ceneri del prodotto, ottenute per calcinazione in muffola a 525 ± 25°C, vengono solubilizzate a caldo con acido cloridrico e sulla soluzione il calcio viene precipitato sotto forma di ossalato e titolato con soluzione di permanganato di potassio.

3. - *Reattivi.*

3.1. - Acido cloridrico concentrato (d = 1,19);

3.2. - Solu[illegible] di ossalato di ammonio al 4% p/v;

3.3. - Soluzione di acido acetico al 20% v/v;

3.4. - Soluzione di idrossido di ammonio al 20% p/v;

3.5. - Soluzione di idrossido di ammonio al 5% p/v;

3.6. - Soluzione di acido solforico al 20% p/v;

3.7. - Permanganato di potassio 0,02N;

3.8. - Soluzione di rosso di metile allo 0,05% in etanolo al 96% v/v.

4. - *Apparecchiatura.*

4.1. - Capsula in platino o quarzo altezza 2,5 cm circa e diametro 7-8 cm.

4.2 - Forno a muffola termostatabile a 525 ± 25°C.

5. - *Campionamento e preparazione.*

Vedi norma n. 1.

6. - *Procedura.*

6.1. - Operare come previsto alla norma n. 10 / punto 5;

6.2. - Riprendere le ceneri con 5 ml di acido cloridrico (3.1) e 50 ml di acqua, trasferire quantitativamente in matraccio da 100 ml, portare all'ebollizione per qualche minuto; raffreddare, portare a volume e filtrare su filtro da quantitativa;

6.3. - Pipettare 5 ml del filtrato in provetta da centrifuga da 30 ml, aggiungere 2 ml di soluzione di ossalato di ammonio (3.2), due gocce di soluzione di rosso di metile (3.8) e 2 ml di acido acetico (3.3) in modo da raggiungere il pH di circa 4,5; alcalinizzare con 2 ml di idrossido di ammonio (3.4) che fa virare l'indicatore dal rosso al giallo, aggiungere acido acetico fino alla ricomparsa del colore rosso (pH 4,5-4,7) e lasciar riposare per almeno 6 ore;

6.4. - Centrifugare ad almeno 1500 rpm per 10 minuti; eliminare il surnatante, lavare le pareti della provetta con 5 ml di idrossido di ammonio (3.5) e centrifugare ancora per 5 minuti; scartare il surnatante e ripetere l'operazione di lavaggio e centrifugazione per altre 2 volte;

6.5. - Aggiungere nella provetta 2 ml di acido solforico (3.6) 5 ml di acqua e porre su bagnomaria bollente fino a sciogliere il precipitato; titolare ad una temperatura di 60-70°C con permanganato di potassio 0,02N fino a colorazione rossa persistente;

6.6. - Effettuare una prova in bianco con le stesse modalità.

7. - *Espressione dei risultati.*

7.1. - Calcolo.

Tenore in calcio espresso in g per 100 g di prodotto $= \dfrac{0{,}8 \cdot (V - V_1)}{p}$

dove:

V = ml di permanganato di potassio 0,02N usati nella titolazione;
V_1 = ml di permanganato di potassio 0,02N usati nella titolazione della prova in bianco;
p = peso del campione iniziale.

7.2. - Ripetibilità.

Inferiore a 0,02 g di calcio su 100 g di prodotto.

Bibliografia.

Norma FIL-IDF 36 : 1966.

13) Determinazione dei cloruri nel formaggio, nel formaggio fuso e nella ricotta.

1. - *Scopo e campo di applicazione.*

Determinazione del tenore dei cloruri nel formaggio, nel formaggio fuso e nella ricotta.

2. - *Principio del metodo.*

Il prodotto viene disciolto in una soluzione di idrossido di sodio da cui vengono precipitate le sostanze proteiche acidificando nettamente con acido nitrico. Sul filtrato limpido si determina, per titolazione argentometrica, lo ione cloro in presenza di allume di ferrico ammonico come indicatore.

3. - *Reattivi.*

3.1. - Acido nitrico al 33% circa p/v (d = 1,20);

3.2. - Soluzione di idrossido di sodio circa al 4% p/v;

3.3. - Nitrobenzolo;

3.4. - Nitrato di argento 0,1N;

3.5. - Solfocianuro di ammonio 0,1N;

3.6. - Soluzione di solfato ferrico ammonico al 4% p/v circa;

4. - *Campionamento e preparazione.*

Vedi norma n. 1.

5. - *Procedura.*

5.1. - Preparazione.

Pesare esattamente 4 g circa di campione in beker da 50 ml, aggiungere poco a poco 30 ml di acqua alla temperatura di 45-50°C e 10 ml della soluzione di idrossido di sodio (3.2), disgregando il prodotto con bacchetta di vetro fino a ridurlo ad un impasto omogeneo e senza grumi; travasare quantitativamente in matraccio da 100 ml, sempre con acqua tiepida, fino ad un volume di 70 ml, aggiungere 20 ml di acido nitrico (3.1) agitando energicamente, portare a volume di 100 ml ed attendere 1 ora, filtrare su filtro da quantitativa, scartare i primi ml e raccogliere il filtrato limpido.

5.2. - Determinazione.

Pipettare 50 ml del filtrato in beuta da 300 ml, aggiungere 20 ml di nitrato argento (3.4), 5 ml di nitro-benzolo (3.3) e 5 ml di solfato ferrico ammonico (3.6), agitare e titolare con solfocianuro di ammonio 0,1N (3.5) fino a colorazione rosso-mattone persistente per alcuni secondi.

5.3. - Prova in bianco.

Con le stesse modalità effettuare una prova in bianco.

6. - *Espressione dei risultati.*

6.1. - Calcolo.

Tenore di cloruri espresso in g per 100 g di prodotto $= \frac{(V_1 - V_2) \cdot f}{p}$

dove:

V_1 = ml di soluzione di solfocianuro utilizzata per la prova in bianco;
V_2 = ml di soluzione di solfocianuro utilizzata per il campione;
p = peso del campione alla titolazione;
f = fattore numerico che è uguale a 0,355 o 0,585 a seconda che i risultati vengano espressi rispettivamente in g di ione cloro o di cloruro di sodio per 100 g di prodotto.

6.2. - Ripetibilità.

Inferiore a 0,04 g di cloro o 0,06 di cloruro di sodio su 100 g di prodotto.

Bibliografia.

Norma FIL-IDF 17 A : 1972.

Manuel Suisse des denrées alimentaires: Office Central Federal des imprimés et du matériel, Berne 1973; 5ª ed, 2° vol, cap 2, pag 13.

14) DETERMINAZIONE DEL FOSFORO TOTALE NEL FORMAGGIO, NEL FORMAGGIO FUSO E NELLA RICOTTA.

1. - *Scopo e campo di applicazione.*

Determinazione del tenore di fosforo totale nel formaggio, nel formaggio fuso e nella ricotta.

2. - *Principio del metodo.*

Dopo la distruzione della sostanza organica per mineralizzazione ad umido con acido solforico e perclorato di potassio, i fosfati vengono fatti reagire, in opportune condizioni, con molibdato di ammonio ed acido ascorbico come agente riducente, con la formazione di un complesso fosfo-molibdico blu, valutabile per via spettrofotometrica.

3. - *Reattivi.*

3.1. - Acido solforico concentrato (d = 1,84) esente da arsenico;

3.2. - Acido solforico 8N: versare con precauzione 215 ml di acido solforico concentrato in un matraccio da 1 litro contenente circa 500 ml di acqua, raffreddare e portare a volume;

3.3. - Perclorato di potassio in cristalli;

3.4. - Soluzione di molibdato di ammonio 1,44% p/v;

3.5. - Soluzione di acido ascorbico 2,5% p/v preparata al momento dell'uso;

3.6. - Fosfato monopotassico.

4. - *Apparecchiatura.*

4.1. - Spettrofotometro.

5. - *Campionamento e preparazione.*

Vedi norma n. 1.

6. - *Procedura.*

6.1. - Introdurre circa 1 g di campione esattamente pesato in un pallone Kjeldhal da 200 ml a collo lungo con 12,5 ml di acido solforico concentrato (3.1) e alcune palline di vetro. Scaldare prima a piccola fiamma e poi sempre più energicamente fino a che non si abbia più schiumeggiamento; aggiungere con cautela qualche cristallo di perclorato potassico (3.3) e mantenere in ebollizione fino a che il liquido diventi perfettamente incolore. Lasciar raffreddare, riprendere con poca acqua e travasare quantitativamente in matraccio da 250 ml portando a volume; prelevare 20 ml della soluzione e trasferirli in matraccio da 250 ml portando a volume con acqua;

6.2. - Pipettare 50 ml di quest'ultima soluzione (6.1) in matraccio da 100 ml, aggiungervi 5,6 ml di acido solforico 8N (3.2), 5 ml di soluzione di molibdato ammonico (3.4), 2 ml della soluzione di acido ascorbico (3.5) ed acqua fino ad un volume di 90 ml circa; immergere in bagno maria bollente per 30 minuti, togliere, raffreddare e portare a volume;

6.3. - Preparare con le stesse modalità una prova in bianco a partire da 6.1;

6.4. - Leggere allo spettrofotometro la D.O. a 650 nm contro il bianco.

6.5. - Curva di taratura.

6.5.1. - Introdurre 0,4392 gi di fosfato monopotassico, preventivamente essiccato in stufa a 110°C, in un matraccio da 1 litro e portare a volume con acqua; trasferire con pipetta di precisione 50 ml della soluzione in matraccio da 500 ml portando a volume con acqua: 1 ml di questa soluzione contiene 10 microgrammi di fosforo;

6.5.2. - Prelevare con pipette di precisione da quest'ultima soluzione porzioni di 5, 10, 15, 20, 25, 30 ml (corrispondenti rispettivamente a 50, 100, 150, 200, 250, 300 microgrammi di fosforo); trasferirle in altrettanti matracci da 100 ml, aggiungere acqua fino a 50 ml circa e procedere all'aggiunta dei reattivi ed alle successive operazioni come indicato al (6.2);

6.5.3. - Costruire una curva di taratura con i valori di D.O. ottenuti in funzione dei microgrammi di fosforo contenuti in ciascun matraccio.

7. - *Espressione dei risultati.*

7.1. - Calcolo.

Tenore in fosforo espresso in g per 100 g di prodotto $= \dfrac{P \cdot n}{p \cdot 10.000}$

dove:

P = quantità in microgrammi di fosforo ottenuta come indicato;
n = numero delle diluizioni totali;
p = peso in g del campione iniziale.

7.2. - Ripetibilità.

Inferiore a 0,03 g di fosforo (P) su 100 g di prodotto.

8. - *Osservazioni.*

La reazione colorimetrica al blu fosfo-molibdico avviene in modo corretto solo se le concentrazioni in acido solforico nel matraccio da 100 ml portato in bagno maria per lo sviluppo del colore sono comprese fra 35 e 45 meq. (cioè richiedono per la titolazione da 35 a 45 ml di NaOH 1N); in caso diverso si hanno risultati errati pe formazione di blu di molibdeno puro. È pertanto necessario controllare periodicamente il titolo della soluzione di acido solforico 8N. Tutta la vetreria deve essere accuratamente lavata con miscela cromica.

Bibliografia

FERRARI C.: *Gazz. Chim. Ital.* 81, 795 (1951).

PALLOTTA U.: *Concimi e concimazioni*, 2, 3 (1958).

Norma provvisoria FIL-IDF 33B : 1982.

15) DETERMINAZIONE DEGLI EMULSIONANTI FOSFATICI NEL FORMAGGIO FUSO.

1. - *Scopo e campo di applicazione.*

Determinazione del tenore di emulsionanti fosfatici nel formaggio fuso.

2. - *Principio del metodo.*

Si assume che in un formaggio il rapporto P/N abbia un valore massimo di 0,14. In base al suo contenuto in azoto e pertanto possibile attribuire ad esso il livello massimo di fosforo naturalmente presente (P pertinente).

Detraendo dal P totale il P pertinente si risale alla quantità degli emulsionanti fosfatici.

3. - *Procedura.*

Determinare il tenore in fosforo totale ed azoto totale rispettivamente secondo le norme n. 14 e n. 6.

4. - *Espressione dei risultati.*

Tenore in g degli emulsionanti fosfatici, espressi in polifosfati di sodio, per 100 g di prodotto =

$$\frac{(P - 0{,}14N) \cdot 2{,}29}{0{,}70}$$

dove:

P = tenore in fosforo totale su 100 g di prodotto;
N = tenore in azoto totale su 100 g di prodotto;
2,29 = fattore di conversione del fosforo in anidride fosforica;
0,14 = rapporto P/N;
0,70 = fattore che rappresenta il titolo in anidride fosforica del polifosfato di sodio.

Bibliografia.

Norma FIL-IDF 51 : 1969.

16) DETERMINAZIONE DELL'ACIDO CITRICO E CITRATI NEL FORMAGGIO, NEL FORMAGGIO FUSO E NELLA RICOTTA.

1. - *Scopo e campo di applicazione.*

Determinazione del tenore di acido citrico ed in citrati nel formaggio, nel formaggio fuso e nella ricotta.

2. - *Principio del metodo.*

Il prodotto, disperso in acqua, a caldo, viene deproteinizzato mediante aggiunta di acido tricloroacetico e successiva filtrazione. Il filtrato, trattato con piridina e anidride acetica, sviluppa una colorazione gialla valutabile per via spettrofotometrica e correlabile alla quantità di acido citrico e suoi sali presenti nell'estratto.

3. - *Reattivi.*

3.1. - Soluzione di acido tricloracetico al 30% p/v;

3.2. - Piridina;

3.3. - Anidride acetica;

3.4. - Soluzione standard di citrato: trasferire 0,9565 g di citrato trisodico biidrato in un pallone tarato da 1000 ml, sciogliere e portare a volume con acqua; 1 ml di questa soluzione corrisponde a 625 microgrammi di acido citrico.

4. - *Apparecchiatura.*

4.1. - Mortaio di porcellana da 50 ml circa e relativo pestello;

4.2. - Provette da 15 ml circa munite di tappo di vetro o materiale inerte;

4.3. - Bagnomaria termostatabile a 32°C + 1°C;

4.4. - Spettrofotometro.

5. - *Campionamento e preparazione.*

Vedi norma n. 1.

6. - *Procedura.*

6.1. - Determinazione.

6.1.1. - Porre nel mortaio circa 0,5 g esattamente pesati di campione sminuzzato. Stemperare con il pestello aggiungendo piccole porzioni di acqua calda (60-70°C). Travasare il contenuto del mortaio in un matraccio tarato da 100 ml usando non più di 50 ml di acqua e lasciar raffreddare a temperatura ambiente; aggiungere 40 ml di acido tricloroacetico (3.1) e portare a volume con acqua;

6.1.2. - Lasciare a riposo per 30 minuti a temperatura ambiente, filtrare su filtro asciutto scartando le prime frazioni (almeno 10 ml) fino ad ottenere un liquido limpido;

6.1.3. - Introdurre mediante pipetta 1 ml di filtrato limpido nella provetta (4.2);

6.1.4. - Aggiungere 1,3 ml di piridina, mescolare ed aggiungere immediatamente 5,7 ml di anidride acetica: tappare mescolare accuratamente e porre in bagnomaria (4.3);

6.1.5. - Togliere dopo 30 mimuti la provetta dal bagnomaria e lasciare raffreddare a temperatura ambiente. Misurare entro 30 minuti la D.O. della soluzione a 428 nm, usando come riferimento la prova in bianco (6.2); risalire ai microgrammi di acido citrico per mezzo della curva di taratura (6.3).

6.2. - Preparare con le stesse modalità una prova in bianco a partire da 6.1.

6.3. - Curva di taratura.

6.3.1. - Introdurre in palloni tarati da 50 ml rispettivamente 0-4-8-12-16 ml di soluzione standard di citrato (3.4), aggiungere a ciascun pallone acqua fino ad un volume di circa 25 ml e poi 20 ml della soluzione di acido tricloroacetico, (3.1) agitare e portare a volume con acqua;

6.3.2. - Introdurre 1 ml esatto di ciascuna delle soluzioni precedenti nelle provette (4.2) in modo da ottenere una serie di campioni standard contenenti 0-50-100-150-200-250 microgrammi di acido citrico e procedere come descritto al punto (6.1.4);

6.3.3. - Riportare in grafico le D.O. ottenute in funzione dei microgrammi di acido citrico contenuti in ciascuna provetta.

7. - *Espressione dei risultati.*

7.1. - Calcolo.

Il tenore in g di acido citrico per 100 g di prodotto $= \frac{c}{p \cdot 100}$

dove:

c = microgrammi di acido citrico presenti nella provetta del campione;
p = peso in g del campione.

7.2. - Ripetibilità.

Inferiore a 0,1 g di acido citrico su 100 g di prodotto.

Bibliografia.

Norma FIL-IDF 34B : 1971.

17) DETERMINAZIONE DEGLI EMULSIONANTI A BASE DI CITRATO NEL FORMAGGIO FUSO.

1. - *Scopo e campo di applicazione.*

Determinazione del tenore in emulsionanti a base di citrato nel formaggio fuso.

2. - *Principio del metodo.*

Viene determinato il tenore in acido citrico e lattosio del campione secondo le metodiche appositamente previste. Il tenore degli emulsionanti a base di citrato, espressi in acido citrico, si ottiene sottraendo dal tenore in acido citrico totale ottenuto sul campione il valore dell'acido citrico pertinente alla materia prima, calcolato sulla base di un rapporto costante acido citrico/lattosio.

3. - *Procedura.*

Determinare il tenore in lattosio e in acido citrico + citrati rispettivamente secondo le norme n. 9 e n. 16.

4. - *Espressione dei risultati.*

Tenore in g degli emulsionanti a base di citrato su 100 g di prodotto = C - 0,04 L.

dove:

C = tenore di acido citrico totale su 100 g di prodotto;
L = tenore di lattosio anidro;
0,04 = rapporto massimo ac. citrico/lattosio nelle materie prime.

Bibliografia.

Norma FIL-IDF 52 : 1969.

18) DETERMINAZIONE DELL'ACIDITÀ TITOLABILE NEL FORMAGGIO, NEL FORMAGGIO FUSO E NELLA RICOTTA.

1. - *Scopo e campo di applicazione.*

Determinazione del tenore in acidità titolabile nel formaggio, nel formaggio fuso e nella ricotta.

2. - *Principio del metodo.*

Il prodotto viene sospeso in acqua e l'acidità dell'estratto acquoso ottenuto viene titolata con soluzione alcalina in presenza di fenolftaleina.

3. - *Reattivi.*

3.1. - Idrossido di sodio 0,1N;

3.2. - Soluzione di fenolftaleina all'1% p/v in etanolo 95% v/v;

3.3. - Acqua distillata, bollita di recente.

4. - *Apparecchiatura.*

4.1. - Omogeneizzatore elettrico ad alta velocità;

4.2. - Matraccio tarato da 105 ml.

5. - *Campionamento e preparazione.*

Vedi norma n. 1.

6. - *Procedura.*

6.1. - Pesare esattamente in beker da 100 ml circa 10 g di campione; aggiungere 50 ml di acqua (3.3) e portare a temperatura di circa 40°C; omogeneizzare per 5 minuti;

6.2. - Trasferire quantitativamente la sospensione nel matraccio (4.2) portare a volume con acqua (3.3) e filtrare su carta da filtro a filtrazione rapida;

6.3. - Prelevare 25 ml del filtrato, aggiungere 5 gocce di fenolftaleina e titolare fino al viraggio con idrossido di sodio 0,1N.

7. - *Espressione dei risultati.*

7.1. - Calcolo.

7.1.1. - Acidità espressa in g di acido lattico per 100 g di prodotto $= \frac{V \cdot 0,9}{p}$

7.1.1. - Acidità espressa in meq per 100 g di prodotto $= \frac{V \cdot 0,1}{p} \cdot 100$

dove:

V = ml di NaOH 0,1N utilizzati nella titolazione;
0,9 = fattore di conversione per l'acido lattico;
p = peso in g dell'aliquota di campione utilizzata per la titolazione.

7.2. - Ripetibilità.

Inferiore a 0,2 ml di idrossido di sodio 0,1N nelle titolazioni.

Bibliografia.

SAVINI E.: *Chimica ed analisi del latte e dei latticini;* Edizione Hoepli 1946 - MI.

19*A)* DETERMINAZIONE DELL'ACIDO L-LATTICO E DEL L-LATTATO NEL FORMAGGIO, NEL FORMAGGIO FUSO E NELLA RICOTTA.

1. - *Scopo e campo di applicazione.*

Determinazione del tenore in acido L-lattico e in L-lattato nel formaggio, nel formaggio fuso e nella ricotta.

2. - *Principio del metodo.*

La determinazione enzimatica dell'acido L-lattico e del L-lattato viene eseguita su un estratto acquoso del prodotto utilizzando gli enzimi L-lattato deidrogenasi (L-LDH) e glutammatopiruvato transaminasi (GPT) in presenza del cofattore nicotinamide adenina dinucleotide (NAD^+). La forma ridotta del cofattore (NADH), prodotta in quantità equivalente al L-lattato, viene dosata spettrofotometricamente.

3. - *Reattivi.*

3.1. - Acqua bidistillata ottenuta con distillatore in vetro.

3.2. - Soluzione di acido L-glutammico 0,1 M in tampone glicilglicina 0,6 M a pH 10: sciogliere in un pallone tarato da 50 ml, 3,96 g di glicilglicina e 0,73 g di acido L-glutammico con circa 40 ml di acqua (3.1), aggiungere 3,8 ml di soluzione di idrossido di sodio 10 M e portare a volume con acqua (3.1). La soluzione è stabile per almeno tre mesi se conservata in frigorifero.

3.3. - Soluzione di nicotinamide adenina dinucleotide 47 mM: sciogliere 0,21 g di β-nicotinamide adenina dinucleotide monoidrato (β-NAD^+) in 6 ml di acqua (3.1). La soluzione è stabile almeno un mese se conservata in frigorifero.

3.4. - Soluzione dell'enzima glutammato-piruvato transaminasi: centrifugare una sospensione commerciale dell'enzima (solitamente in ammonio solfato 3,2 M e con attività specifica di circa 80 U/mg) a 4000 rpm per 10 minuti; prelevare il surnatante limpido e scartare il residuo. La soluzione è stabile almeno un anno se conservata in frigorifero.

3.5. - Soluzione dell'enzima L-lattato deidrogenasi: soluzione commerciale dell'enzima (solitamente in miscela glicerolo-acqua, da 10 mg/ml e con attività specifica di circa 550 U/mg). La soluzione è stabile almeno un anno se conservata in frigorifero.

3.6. - Soluzione di L-lattato 0,5 mM: sciogliere 49 mg di L-lattato di litio anidro in 100 ml di acqua (3.1): preparare al momento.

4. - *Apparecchiatura.*

4.1. - Pipette con puntali monouso per volumi di 20, 100, 200, 1000 microlitri.

4.2. - Spettrofotometro.

4.3. - Cuvette in quarzo con cammino ottico di 1 cm.

4.4. - Bacchette con estremità appiattite, tali da entrare, nelle cuvette (4.3).

4.5. - Bagnomaria termostato a 60° C.

5. - *Campionamento e preparazione.*

Vedi norma n. 1.

6. - *Procedura.*

6.1. - Estrazione del campione.

6.1.1. - Pesare esattamente 1 g circa di campione in un pallone tarato da 100 ml; aggiungere 80 ml di acqua (3.1) e scaldare su bagnomaria per 15 minuti agitando di tanto in tanto; lasciare raffreddare a temperatura ambiente e portare a volume con acqua (3.1).

6.1.2. - Porre la sospensione in frigorifero per almeno 15 minuti onde avere la separazione del grasso; filtrare su filtro da quantitativa raccogliendo il filtrato limpido.

6.2. - Determinazione.

6.2.1. - Pipettare nella cuvetta con pipette (4.1) nell'ordine: 1 ml di soluzione di acido L-glutammico in tampone glicilglicina (3.2); 0,2 ml di soluzione di NAD^+ (3.3); 0,9 ml di acqua (3.1); 0,02 ml della soluzione dell'enzima GPT (3.4) e 0,1 ml dell'estratto del campione (6.1.2); mescolare con l'apposita bacchetta (4.4) e lasciar riposare per 5 minuti.

6.2.2. - Misurare la D.O. a 340 nm contro acqua (3.1): sia EIC (Estinzione iniziale del campione) la D.O. letta.

6.2.3. - Aggiungere nella cuvetta 0,2 ml di soluzione dell'enzima L-LDH (3.5) mescolare e lasciar riposare per 10 minuti.

6.2.4. - Misurare la D.O. a 340 nm contro acqua (3.1): sia E2C (Estinzione finale del campione) la D.O. letta.

6.2.5. - Effettuare a distanza di 5 minuti una nuova lettura della D.O.: se questa aumenta proseguire con letture ad intervalli di 5 minuti finché la differenza fra le ultime due risulti praticamente trascurabile; sia E2C l'ultimo valore letto.

6.3. - Prova in bianco.

Procedere come descritto da (5.2.1); sostituendo 0,1 ml di acqua (3.1) al campione; siano E1B e E2B le D.O. lette prima e dopo l'aggiunta dell'enzima L-LDH (3.5).

6.4. - Prova di recupero.

Verificare per ogni nuovo lotto di reagenti il recupero della determinazione. A tale scopo procedere come descritto in (6.2) sostituendo all'estratto del campione 0,1 ml della soluzione standard di L-lattato (3.6); il valore del recupero deve essere del 100 ± 2%.

7. - *Espressione dei risultati.*

7.1. - Calcolo.

Tenore in acido L-lattico e L-lattato, espresso in g di acido L-lattico per 100 g di prodotto =

$$\frac{20{,}18 \cdot E}{\varepsilon \cdot P} = \frac{3{,}2 \cdot E}{P}$$

dove:

E = (E2C - E1C) - (E2B - E1B);
ε = coefficiente di estinzione molare a 340 nm del NADH pari a 6,3;
P = Peso in g del campione.

7.2. - Ripetibilità.

Inferiore a 0,2 g di acido L-lattico su 100 g di prodotto.

8. - *Osservazioni.*

8.1. - Il contenuto in acido L-lattico nella cuvetta deve essere compreso fra 2 e 20 microgrammi; per valori superiori procedere ad un'adeguata diluizione dell'estratto.

8.2. - La temperatura di lavoro ottimale deve essere compresa tra 20 e 25° C.

8.3. - Controllare sempre la data di scadenza delle soluzioni degli enzimi; oltre tale data i valori di attività indicati sulle confezioni sono scarsamente attendibili.

Bibliografia.

NOLL F.: *Methods of Enzymatic Analysis*, Ed. H.U. Bergmeyer, vol. 3, 1475-1479 (1974); Verlag Chemie Weinheim/Academic Press. Inc., New York and London.

19*B)* DETERMINAZIONE DELL'ACIDO D-LATTICO E DEL D-LATTATO NEL FORMAGGIO, NEL FORMAGGIO FUSO E NELLA RICOTTA.

1. - *Scopo e campo di applicazione.*

Determinazione del tenore in acido D-lattico e in D-lattato nel formaggio, nel formaggio fuso e nella ricotta.

2. - *Principio del metodo.*

La determinazione enzimatica dell'acido D-lattico e del D-lattato viene eseguita su un estratto acquoso del prodotto utilizzando gli enzimi D-lattato deidrogenasi (D-LDH) e glutammatopiruvato transaminasi (GPT) in presenza del cofattore nicotinamide adenina dinucleotide (NAD^+). La forma ridotta del cofattore (NADH), prodotta in quantità equivalente al D-lattato, viene dosata spettrofotometricamente.

3. - *Reattivi.*

Tutti i reattivi previsti alla norma n. 19*A* punti (3.1) - (3.2) - (3.3) - (3.4).

3.5. - Soluzione dell'enzima D-lattato deidrogenasi: soluzione commerciale dell'enzima (solitamente in miscela glicerolo-acqua, da 5 mg/ml e con attività specifica di circa 300 U/mg).

La soluzione è stabile almeno un anno se conservata in frigorifero.

3.6. - Soluzione di D-lattato 0,5 mM: sciogliere 49 mg di D-lattato di litio anidro in 100 ml di acqua (3.1); preparare nella stessa giornata dell'uso.

4. - *Apparecchiatura.*

Tutta l'apparecchiatura della norma n. 19A/punto 4.

5. - *Campionamento e preparazione.*

Vedi norma n. 1.

6. - *Procedura.*

6.1. - Estrazione del campione.

6.1.1. - Pesare esattamente 1 g circa di campione in un pallone tarato da 100 ml; aggiungere 80 ml di acqua (3.1) e scaldare su bagno maria (4.5) per 15 minuti agitando di tanto in tanto; lasciare raffreddare a temperatura ambiente e portare a volume con acqua (3.1).

6.1.2. - Porre la sospensione in frigorifero per 15 minuti onde avere la separazione del grasso; filtrare su filtro da quantitativa raccogliendo il filtrato limpido.

6.2. - Determinazione.

6.2.1. - Pipettare nella cuvetta con pipette automatiche (4.1) nell'ordine: 1 ml di soluzione di acido L-glutammico in tampone glicil-glicina (3.2); 0,2 ml di soluzione di NAD^+ (3.3.); 0,9 ml di acqua (3.1); 0,02 ml della soluzione dell'enzima GPT (3.4) e 0,1 ml dell'estratto del campione (6.1.2); mescolare con l'apposito agitatore (4.4) e lasciar riposare per 5 minuti.

6.2.2. - Misurare la D.O. a 340 nm contro acqua (3.1): sia E1C (Estinzione iniziale del campione) la D.O. letta.

6.2.3. - Aggiungere nella cuvetta 0,2 ml di soluzione dell'enzima D-LDH (3.6) mescolare e lasciar riposare per 10 minuti.

6.2.4. - Misurare la D.O. a 340 nm contro acqua (3.1): sia E2C (Estinzione finale del campione) la D.O. letta.

6.2.5. - Effettuare a distanza di 5 minuti una nuova lettura della D.O., se questa aumenta proseguire con letture ad intervalli di 5 minuti finché la differenza fra le ultime due risulti trascurabile; sia E2C l'ultimo valore letto.

6.3. - Prova in bianco.

Procedere come descritto da (6.2.1.); sostituendo 0,1 ml di acqua (3.1) al campione; siano E1B e E2B le D.O. lette prima e dopo l'aggiunta dell'enzima D-LDH.

6.4. - Prova di recupero.

Verificare per ogni nuovo lotto di reagenti il recupero della determinazione. A tale scopo procedere come descritto in 6.2. sostituendo all'estratto del campione 0,1 ml della soluzione standard di D-lattato (3.6); il valore del recupero deve essere del 100 ± 2%.

7. - *Espressione dei risultati.*

7.1. - Calcolo.

Tenore in acido D-lattico e D-lattato, espresso in g di acido D-lattico per 100 g di prodotto

$$\frac{20,18 \cdot E}{\varepsilon \cdot P} = \frac{3,2 \cdot E}{P}$$

dove:

E = (E2C - E1C) - (E2B - E1B);
ε = coefficiente di estinzione molare a 340 nm del NADH pari a 6,3;
P = Peso in g del campione.

7.2. - Ripetibilità.

Inferiore a 0,2 g di acido D-lattico su 100 g di prodotto.

8 - *Osservazioni.*

8.1. - Il contenuto in acido D-lattico nella cuvetta deve essere compreso fra 2 e 20 microgrammi; per valori superiori procedere ad un'adeguata diluizione dell'estratto.

8.2. - La temperatura di lavoro ottimale deve essere compresa tra 20 e 25° C.

8.3. - Controllare sempre la data di scadenza delle soluzioni degli enzimi; oltre tale data i valori di attività indicati sulle confezioni sono scarsamente attendibili.

Bibliografia.

NOLL F.: *Methods of Enzymatic Analysis*, Ed. H.U. Bergmeyer, vol. 3, 1475-1479 (1974); Verlag Chemie Weinheim/Academic Press. Inc., New York and London.

20) DETERMINAZIONE DEL pH NEL FORMAGGIO, NEL FORMAGGIO FUSO E NELLA RICOTTA.

1. - *Scopo e campo di applicazione.*

Determinazione potenziometrica del pH nel formaggio, nel formaggio fuso e nella ricotta.

2. - *Reattivi.*

2.1. - Acqua distillata bollita di recente.

2.2. - Soluzioni tampone a pH 4,0 e 7,0 per la taratura dello strumento.

3. - *Apparecchiatura.*

3.1. - pHmetro con elettrodo a vetro della sensibilità di almeno 0,05 Unità di pH.

3.2. - Centrifuga con velocità fra 2000 e 3000 rpm.

4. - *Campionamento e preparazione.*

Vedi norma n. 1.

5. - *Procedura.*

5.1. - Pesare in un beker da 200 ml 10 g di prodotto, aggiungere 100 ml di acqua (2.1) ed agitare energicamente su agitatore magnetico per 15 minuti circa.

5.2. - Centrifugare la sospensione per alcuni minuti e separare per decantazione il surnatante.

5.3. - Azzerare e tarare il pHmetro con i due tamponi a pH 4,0 e 7,0 portati a temperatura ambiente.

5.4. - Misurare il pH immergendo l'elettrodo nella soluzione (5.2) portata a temperatura ambiente.

6. - *Ripetibilità.*

$\pm$ 0,05 unità di pH.

21) DETERMINAZIONE DEL SODIO NEL FORMAGGIO, NEL FORMAGGIO FUSO E NELLA RICOTTA.

1. - *Scopo e campo di applicazione.*

Determinazione del tenore in sodio nel formaggio, nel formaggio fuso e nella ricotta.

2. - *Principio del metodo.*

Dopo la distruzione della sostanza organica per mineralizzazione ad umido con acido solforico ed acido nitrico, la soluzione opportunamente diluita viene vaporizzata su fiamma aria acetilene di uno spettrofotometro ad assorbimento atomico.

3. - *Reattivi.*

3.1. - Acido solforico concentrato (d = 1,84) purissimo.

3.2. - Acido nitrico fumante al 90% (d = 1,48) purissimo.

3.3. - Cloruro di sodio purissimo essiccato in stufa a 105° C per 24 ore e conservato in essiccatore.

3.4. - Acqua bidistillata o demineralizzata di purezza almeno equivalente.

4. - *Apparecchiatura.*

4.1. - Spettrofotometro ad assorbimento atomico.

4.2. - Lampada a catodo cavo per il sodio.

4.3. - Gas di alimentazione aria/acetilene.

5. - *Campionamento e preparazione.*

Vedi norma n. 1.

6. - *Procedura.*

6.1. - Pesare esattamente 1 g circa di campione ed introdurlo in un pallone Kjeldhal da 100 ml a collo lungo, aggiungere 5 ml di acido solforico (3.1), alcune palline di vetro perfettamente lavate e 2 ml di acido nitrico (3.2), a mezzo di imbuto separatore a gambo lungo, e iniziare l'attacco a media fiamma; all'inizio della carbonizzazione della massa abbassare il riscaldamento e continuare l'aggiunta di opportune quantità di acido nitrico regolando la fiamma fino a che il liquido passi dal bruno a giallo chiaro; alla fine dell'attacco la soluzione, dopo raffreddamento, deve essere incolore.

6.2. - Travasare quantitativamente in matraccio tarato da 100 ml portando a volume con acqua (3.4).

6.3. - Prova in bianco.

Effettuare le stesse operazioni del punto (6.1) con tutti i reattivi meno il campione.

6.4. - Determinazione.

6.4.1. - Prelevare con pipetta di precisione 1 ml della soluzione (6.2) e trasferire in matraccio da 100 ml portando a volume con acqua (3.4).

6.4.2. - Leggere la D.O. di questa ultima soluzione allo spettrofotometro ad assorbimento atomico alla lunghezza d'onda di 589 nm e sottrarre il valore della D.O. del bianco (6.3).

6.5. - Curva di taratura.

6.5.1. - Pesare esattamente 2,542 g di cloruro di sodio (3.3), trasferirli quantitativamente in un matraccio tarato da 1000 ml e portare a volume con acqua (3.4).

Mediante pipetta tarata di precisione prelevare 10 ml della soluzione e trasferirli in un matraccio tarato da 100 ml portando a volume con acqua (3.4): questa soluzione contiene 100 ppm di sodio.

6.5.2. - Mediante pipette di precisione prelevare 0,5-1,0-1,5 ml della soluzione (6.5.1) trasferirli in altrettanti matracci da 100 ml e portare a volume con acqua (3.4): le soluzioni contengono rispettivamente 0,5-1,0-1,5 ppm di sodio.

6.5.3. - Con i valori delle D.O. di tali soluzioni, misurati come al punto (6.4.2) e detratto del valore di D.O. del bianco (acqua 3.4) costruire la curva di taratura.

7. - *Espressione dei risultati.*

7.1. - Calcolo.

$$\text{Tenore in sodio del prodotto espresso in ppm} = \frac{C \cdot N}{p}$$

dove:

C = concentrazione del sodio ricavata dalla curva di taratura;
N = fattore di diluizione;
p = peso in g del campione.

7.2. - Ripetibilità.

Inferiore a 10 ppm di sodio.

8. - *Osservazioni.*

8.1. - Lavare accuratamente tutta la vetreria che non deve assolutamente contenere tracce di sodio.

8.2. - Le soluzioni standard di riferimento vanno conservate in flaconi di politene, con tappi a perfetta tenuta.

8.3. - Per ogni serie di determinazioni è opportuno controllare almeno un punto della curva di taratura.

Bibliografia.

Analytical Methods for Atomic Absortion Spectrophotometry, the Perkin-Elmer Corp., Norwalk, Conn., U.S.A., 1973.
Manuel suisse des denrees alimentaires: Office Central Federal des imprimés et du matériel, Berne 1973; 5° ed., 2° vol., cap. 1, pg. 30.

22) DETERMINAZIONE DEL POTASSIO NEL FORMAGGIO, NEL FORMAGGIO FUSO E NELLA RICOTTA.

1. - *Scopo e campo di applicazione.*

Determinazione del tenore in potassio nel formaggio, nel formaggio fuso e nella ricotta.

2. - *Principio del metodo.*

Dopo la distruzione della sostanza organica per mineralizzazione ad umido con acido solforico ed acido nitrico, la soluzione opportunamente diluita viene vaporizzata su fiamma aria/acetilene di uno spettrofotometro ad assorbimento atomico.

3. - *Reattivi.*

3.1. - Acido solforico concentrato (d = 1,84) purissimo.

3.2. - Acido nitrico fumante al 90% (d = 1,48) purissimo.

3.3. - Cloruro di potassio purissimo essiccato in stufa a 105° C per 24 ore e conservato in essiccatore.

3.4. - Acqua bidistillata o demineralizzata di purezza almeno equivalente.

4. - *Apparecchiatura.*

4.1. - Spettrofotometro ad assorbimento atomico.

4.2. - Lampada a catodo cavo per il potassio.

4.3. - Gas di alimentazione: aria/acetilene.

5. - *Campionamento e preparazione.*

Vedi norma n. 1.

6. - *Procedura.*

6.1. - Pesare esattamente 1 g circa di campione ed introdurlo in un pallone Kjedhal da 100 ml a collo lungo, aggiungere 5 ml di acido solforico (3.1), alcune palline di vetro perfettamente lavate, e 2 ml di acido nitrico (3.2), a mezzo imbuto separatore a gambo lungo ed iniziare l'attacco a media fiamma; all'inizio della carbonizzazione della massa abbassare il riscaldamento e continuare l'aggiunta di opportune quantità di acido nitrico regolando la fiamma fino a che il liquido passi dal bruno al giallo e poi al giallo chiaro; alla fine dell'attacco la soluzione, dopo raffreddamento, deve essere incolore.

6.2. - Travasare quantitativamente in matraccio tarato da 100 ml portando poi a volume con acqua (3.4).

6.3. - Prova in bianco.

Effettuare le stesse operazioni del punto (6.1) con tutti i reattivi meno il campione.

6.4. - Determinazione.

Leggere la D.O. della soluzione (6.2) allo spettrofotometro di assorbimento atomico, alla lunghezza d'onda di 766,5 nm e sottrarre il valore della D.O. del bianco (6.3).

6.5. - Curva di taratura.

6.5.1. - Pesare esattamente 1,907 g di cloruro di potassio (3.3) trasferirli quantitativamente in matraccio tarato da 1000 ml e portare a volume con acqua (3.4). Mediante pipetta tarata di precisione prelevare 10 ml della soluzione, trasferirli in matraccio tarato da 100 ml e portare a volume con acqua (3.4): questa soluzione contiene 100 ppm di potassio.

6.5.2. - Mediante pipette di precisione prelevare 2, 3, 4, 5, 6 ml della soluzione (6.5.1), trasferirli in altrettanti matracci da 100 ml e portare poi a volume con acqua (3.4): le soluzioni contengono rispettivamente 2, 3, 4, 5, 6 ppm di potassio.

6.5.3. - Con i valori delle D.O. di tali soluzioni, misurati come al punto (6.4) detratti del valore di D.O. del bianco (acqua 3.4) costruire la curva di taratura.

7. - *Espressione dei risultati.*

7.1. - Calcolo.

Tenore in potassio del prodotto espresso in ppm $= \dfrac{C \cdot N}{p}$

dove:

C = concentrazione del potassio ricavata dalla curva di taratura;
N = fattore di diluizione;
p = peso in g del campione.

7.2. - Ripetibilità.

Inferiore a 10 ppm di potassio.

8. - *Osservazioni.*

Come alla norma n. 21/punto 8.

Bibliografia.

Analytical Methods for Atomic Absortion Spectrophotometry, the Perkin-Elmer Corp., Norwalk, Conn., U.S.A., 1973.

Manuel suisse des denrees alimentaires: Office Central Federal des imprimés et du matériel, Berne 1973; 5° ed., 2° vol., cap. 1, pg. 30.

23) DETERMINAZIONE DEI NITRATI NEL FORMAGGIO, NEL FORMAGGIO FUSO E NELLA RICOTTA.

1. - *Scopo e campo di applicazione.*

Determinazione del tenore in ione nitrato nel formaggio, nel formaggio fuso e nella ricotta.

2. - *Principio del metodo.*

Il prodotto sospeso in acqua viene deproteinizzato e sgrassato col reattivo di Carrez: dopo filtrazione ed evaporazione il residuo viene fatto reagire con 2-4 dimetilfenolo in presenza di acido solforico e solfato di argento per formare un nitro-composto colorato distillabile per via spettrofotometrica.

3. - *Reattivi.*

3.1. - Acqua bidistillata o demineralizzata di purezza almeno equivalente.

3.2. - Acido solforico concentrato (d = 1,84).

3.3. - Reattivo alla difenilamina: sciogliere 0,5 g di difenilamina in 100 ml di acido solforico (3.2) aggiungere 20 ml di acqua (3.1) e mescolare: conservare al buio.

3.4. - Reattivo di Carrez.

3.4.1. - Soluzione di Carrez 1°: sciogliere 53,5 g di solfato di zinco eptaidrato in acqua (3.1) e portare a 100 ml.

3.4.2. - Soluzione di Carrez 2°: sciogliere 17,2 g di ferrocianuro di potassio triidràto in acqua (3.1) e portare a 100 ml.

3.5. - Xilenolo (2-4 dimetilfenolo) distillato di recente e comunque non colorato (la purezza del prodotto è indispensabile per la validità del saggio).

3.6. - Soluzione di solfato di argento in acido solforico: sciogliere 5,4 g di solfato di argento in una miscela di 75 ml di acido solforico (3.2) e 25 ml di acqua (3.1).

3.7. - Soluzione di solfito di sodio in idrossido di sodio: sciogliere 4 g di idrossido di sodio e 20 g di solfito di sodio eptaidrato in acqua (3.1) portando a volume di 100 ml.

3.8. - Nitrato di potassio essiccato e conservato in essiccatore.

4. - *Apparecchiatura.*

4.1. - Apparecchio distillatore in vetro (fig. 9).

4.2. - Evaporatore rotante sotto vuoto con bagnomaria termostatabile.

4.3. - Spettrofotometro.

5. - *Campionamento e preparazione.*

Vedi norma n. 1.

6. - *Procedura.*

6.1. - Pesare esattamente 10 g circa di campione in beker da 100 ml, aggiungere poco a poco 60 ml di acqua (3.1) riscaldata a circa 50° C e spappolare con una bacchetta di vetro il prodotto fino ad avere un tutto omogeneo e senza grumi; usando sempre acqua (3.1) travasare quantitativamente in un matraccio da 100 ml fino ad un volume di 80 ml circa.

6.2. - Aggiungere 2 ml di Carrez 1° e 2 ml di Carrez 2°, agitare, raffreddare, portare a volume con acqua (3.1) e lasciar riposare per 30 minuti.

6.3. - Filtrare su filtro da quantitativa raccogliendo il liquido limpido.

6.4. - Trasferire 40 ml esattamente misurati del filtrato nel pallone di distillazione (fig. 9) ed evaporare sotto vuoto a temperatura non superiore a 35° C in evaporatore rotante (4.2) fino a secchezza.

6.5. - Effettuare una prova in bianco sostituendo l'acqua (3.1) al campione procedendo poi come in (6.6).

6.6. - Determinazione.

6.6.1. - Formazione del nitroxilenolo.

6.6.1.1. - Dopo raffreddamento riprendere il residuo con 1 ml di acqua (3.1) aggiungere 2 gocce di xilenolo (3.5) 2 palline di vetro e 5 ml della soluzione di solfato di argento (3.6).

6.6.1.2. - Chiudere il pallone con tappo di vetro ed agitare energicamente fino ad emulsione; lasciar reagire per 10 minuti esatti a temperatura ambiente agitando con frequenza.

6.6.1.3. - Aggiungere 20 ml di acqua (3.1) per bloccare la nitrazione.

6.2.2. - Distillazione.

Distillare rapidamente in apparecchio (4.1) raccogliendo 7-8 ml di un matraccio tarato da 10 ml contenente 1,5 ml di soluzione (3.7) e portare a volume con acqua (3.1).

6.6.3. - Misura spettrofotometrica.

6.6.3.1. - Misurare la D.O. della soluzione a 450 nm contro acqua (3.1).

6.6.3.2. - Misurare la D.O. della prova in bianco (6.5) contro acqua (3.1); il valore di questa misura deve essere inferiore a 0,020; in caso contrario ripetere la preparazione curando particolarmente il lavaggio della vetreria.

6.6.3.3. - Sottrarre la D.O. della prova in bianco da quella del campione.

6.7. Curva di taratura.

6.7.1. - Trasferire 1,630 g di nitrato di potassio (3.8) esattamente pesati in un matraccio tarato da 1000 ml portando a volume con acqua (3.1). Porre 10 ml di questa soluzione, prelevati con pipetta di precisione in matraccio tarato da 100 ml e portare a volume con acqua (3.1): 1 ml di questa soluzione contiene 100 microgrammi di ione nitrato.

6.7.2. - Trasferire a mezzo pipette di precisione in altrettanti palloni di distillazione aliquote di 0,1-0,2-0,3-0,4 ml della soluzione (6.7.1), corrispondenti rispettivamente a 10-20-30-40 microgrammi di ione nitrato, completando ad 1 ml con acqua (3.1) e proseguire come al punto (6.6).

6.7.3. - Costruire la curva di taratura sottraendo dai valori delle D.O. delle soluzioni standard il valore delle D.O. della prova in bianco (6.6.3.2).

7. - *Espressione dei risultati.*

7.1. - Calcolo.

Tenore in ione nitrato del prodotto espresso in ppm $= \dfrac{2,5 \cdot a}{p}$

dove:

a = valore in microgrammi di ione nitrato ottenuto dalla curva di taratura;
p = peso in g del campione.

7.2. - Ripetibilità.

± 10% del valore medio trovato.

8. - *Osservazioni.*

Tutti i reattivi devono dare reazione negativa con il reattivo alla difenilamina.

Nel caso particolare del solfato di argento commerciale che contiene sempre apprezzabili quantità di nitrati si può procedere in due modi diversi per ottenere un prodotto puro per l'uso.

8.1. - Purificazione del solfato di argento.

Porre 25 g di solfato di argento in beker da 50 ml aggiungere 25 ml di etanolo al 95% v/v agitare con bacchetta di vetro, lasciare sedimentare per qualche minuto il liquido surnatante.

Ripetere l'operazione una seconda volta quindi essiccare il prodotto così ottenuto in stufa termostatata a 60° C. Conservare in essiccatore.

8.2. - Preparazione del solfato di argento puro.

Porre 15 g di lamina di argento finemente tagliuzzata in pallone Kjeldahl da 100 ml, aggiungere 40 ml di acqua (3.1) e portare all'ebollizione; eliminare l'acqua e ripetere la stessa operazione per una seconda volta; aggiungere all'argento 17 ml di acido solforico (3.2) e far bollire fino a completa dissoluzione del metallo, aggiungere 25 ml di acqua (3.1) bollire ancora per qualche minuto e far raffreddare. Raccogliere il solfato di argento finemente cristallizzato in beker, lavare con 25 ml di acqua (3.1) fredda, allontanare per decantazione l'acqua ed essiccare in stufa a 105° C.

Bibliografia.

Manuel Suisses des denrees alimentaires: Office Central Federal des imprimés et du matériel, Berne 1973; 5° ed., 2° vol., cap. 1, pag. 43 e cap. 5 pag. 25. *Gazzetta Ufficiale* n. 337 del 12 dicembre 1977, pag. 8886.
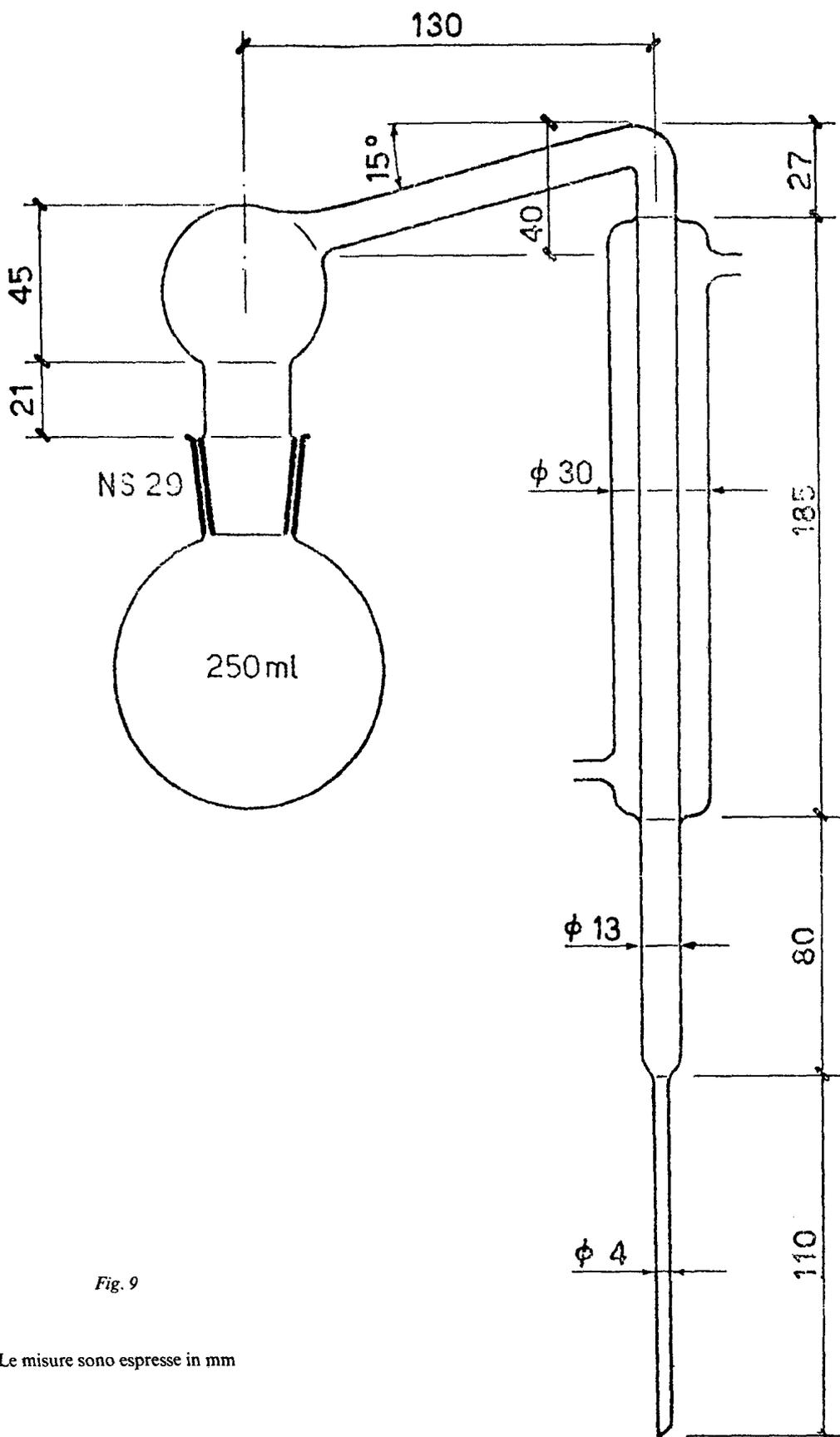
Fig. 9

Le misure sono espresse in mm

24) DETERMINAZIONE DEI NITRITI NEL FORMAGGIO, NEL FORMAGGIO FUSO E NELLA RICOTTA.

1. - *Scopo e campo di applicazione.*

Determinazione del tenore in ione nitrito nel formaggio, nel formaggio fuso e nella ricotta.

2. - *Principio del metodo.*

Il prodotto, sospeso in acqua è deproteinizzato e sgrassato con il reattico di Carrez; il filtrato dopo acidificazione con acido cloridrico, viene trattato con soluzione di sulfanilamide e N-naftiletilendiamina cloridrato che in presenza di ione nitrito produce un composto azoico rosso, valutabile spettrofotometricamente.

3. - *Reattivi.*

3.1. - Soluzione di idrossido di sodio 0,1 N circa.

3.2. - Reattivo di Carrez:

3.2.1. - Soluzione di Carrez 1°: sciogliere 53,5 g di solfato di zinco eptaidrato in acqua e portare a 100 ml.

3.2.2. - Soluzione di Carrez 2°: sciogliere 17,2 g di ferrocianuro di potassio triidrato in acqua e portare a 100 ml.

3.3. - Soluzione di acido cloridrico: diluire 450 ml di acido cloridrico concentrato a 1000 ml con acqua.

3.4. - Soluzione di sulfanilamide: sciogliere scaldando a bagnomaria, 0,5 g di solfanilamide in una miscela costituita da 75 ml di acqua e 5 ml di acido cloridrico concentrato. Raffreddare a temperatura ambiente e portare a volume di 100 ml con acqua.

3.5. - Soluzione di N-naftil-etilendiamina: sciogliere 0,12 g di N-naftil-etilendiamina dicloridrato in acqua e portare a 100 ml. Filtrare se necessario; la soluzione è stabile per una settimana se conservata in frigorifero in recipiente di vetro scuro ben tappato.

3.6. - Soluzione standard di nitrito:

3.6.1. - Soluzione madre: sciogliere in acqua 1,50 g di nitrito di sodio, esattamente pesati ed essiccati in precedenza in stufa a 110° C fino a peso costante, e portare a volume in un matraccio tarato da 1000 ml.

3.6.2. - Controllo del titolo: trasferire con pipetta di precisione in beuta da 500 ml 20 ml di permanganato di potassio 0,1 N, 350 ml di acqua e 25 ml di acido solforico al 10% v/v, agitando e riscaldando a bagnomaria a temperatura non superiore a 40° C; porre la beuta su agitatore magnetico (4.3) e titolare con la soluzione di nitrito (3.6.1) fino a decolorazione del permanganato.

Titolo della soluzione espresso in mg/litro di nitrito di sodio $= \frac{V_1 \cdot 3.45}{V_2} \cdot 1000$

dove:

V_1 = ml di permanganato 0,1 N prelevati;
V_2 = ml di nitrito di sodio impiegati nella titolazione;
3,45 = fattore di conversione per il nitrito di sodio.

3.6.3. - Tenendo conto del titolo reale in nitrito di sodio, diluire opportunamente la soluzione (3.6.1) in modo tale da ottenere una soluzione contenente 1 microgrammo di ione nitrito/ml.

4. - *Apparecchiatura.*

4.1. - Omogeneizzatore munito di recipienti in vetro da 250-400 ml idoneo a frangere ed omogeneizzare.

4.2. - Spettrofotometro.

4.3. - Agitatore magnetico.

5. - *Campionamento e preparazione.*

Vedi norma n. 1.

6. - *Procedura.*

6.1. - Preparazione del campione.

6.1.1. - Pesare esattamente 10 g circa del campione e trasferirli quantitativamente nel recipiente di vetro dell'omogeneizzatore (4.1); aggiungere con un cilindro graduato 175 ml di acqua a 50-55° C e 10 ml della soluzione di idrossido di sodio (3.1), omogeneizzare per alcuni minuti.

6.1.2. - Trasferire quantitativamente la dispersione in matraccio tarato da 250 ml, aggiungere 6 ml di Carrez 1°, miscelare e subito dopo aggiungere 6 ml di Carrez 2°, portare a volume con acqua ed agitare; filtrare dopo circa 5 minuti su filtro da quantitativa raccogliendo il liquido perfettamente limpido.

6.1.3. - Trasferire 25 ml esatti di filtrato in un pallone tarato da 100 ml e portare a volume con acqua.

6.2. - Determinazione.

6.2.1. - Introdurre 25 ml della soluzione (6.1.3) in un pallone tarato da 100 ml, aggiungere acqua fino ad un volume complessivo di 50-60 ml; aggiungere 6 ml di acido cloridrico (3.3) e subito dopo 5 ml della soluzione di solfanilamide (3.4), mescolare e lasciar riposare per 5 minuti a temperatura ambiente ed al riparo dalla luce; aggiungere 2 ml della soluzione di N-naftil-etilendiammina (3.5) mescolare con cura e lasciar riposare ancora per 5 minuti a temperatura ambiente ed al riparo della luce, portare a volume con acqua.

6.2.2. - Misurare entro 15 minuti la D.O. della soluzione in confronto a quella del bianco (6.3) a 538 nm.

6.2.3. - Effettuare un'altra determinazione su di una seconda aliquota della stessa soluzione (6.1.3).

6.3. - Prova in bianco.

Preparare un bianco dei reattivi seguendo la procedura descritta a partire da (6.1.1).

6.4. - Curva di taratura.

6.4.1. - Introdurre a mezzo pipette di precisione in 7 matracci tarati da 100 ml rispettivamente 0-2-4-6-8-10-12 ml della soluzione standard (3.6.3).

6.4.2. - Aggiungere acqua a ciascun pallone fino ad un volume di 60 ml circa e proseguire secondo le modalità descritte al punto (6.2).

6.4.3. - Misurare entro 15 minuti D.O. delle soluzioni standard a 538 nm contro acqua e costruire la curva di taratura.

7. - *Espressione dei risultati.*

7.1. - Calcolo.

Tenore in ione nitrito del prodotto espresso in ppm $= \frac{4000 \cdot C}{p}$

dove:

C = concentrazione in microgrammi/ml ricavata dalla curva di taratura;
p = peso in g del campione.

Prendere come risultato la media aritmetrica delle due determinazioni (6.2.2) e (6.2.3) ed esprimerlo con l'approssimazione di 0,1 ppm. Nel caso di basse concentrazioni di nitrito l'aliquota del filtrato (6.2.1) da sottoporre ad analisi potrà essere aumentata fino a 50 ml, tenendone poi conto nel calcolo.

7.2. - Ripetibilità.

± 10% del valore medio trovato.

Bibliografia.

Methods of Analysis of A.O.A.C., 13 ed. (1980), pag. 266.
Code de principes concernant le lait et les produits latiers, proposition conjoint FIL/ISO/AOAC, annexe IX-1, pg. 88, 19ª sessione (1977).

25) DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ FOSFATASICA NEL FORMAGGIO, NEL FORMAGGIO FUSO E NELLA RICOTTA.

1. - *Scopo e campo di applicazione.*

Determinazione dell'attività fosfatasica nel formaggio, nel formaggio fuso e nella ricotta.

2. - *Principio del metodo.*

L'attività sosfatasica è determinata basandosi sulla capacità della fosfatasi di liberare fenolo dal fenilfosfato bisodico. La quantità di fenolo liberata viene misurata spettrofotometricamente per reazione con la 2-6 dibromochinonclorimide.

3. - *Reattivi.*

3.1. - Acqua distillata bollita di recente.

3.2. - Tampone borato-idrossido di bario a pH 10,6 ± 0,1 a 20°C: sciogliere 25 g di idrossido di bario octaidrato esente da carbonati in acqua (3.1) e portare a 500 ml; sciogliere 11 g di acido borico in acqua (3.1) e portare a 500 ml. Scaldare entrambe le soluzioni a 50°C, riunirle, agitare e raffreddare rapidamente fino a 20°C; se necessario aggiustare il pH con soluzione di idrossido di bario e filtrare. Conservare la soluzione in un recipiente chiuso ermeticamente.

3.3. - Tampone per lo sviluppo del colore: sciogliere 6 g di metaborato di sodio e 20 g di cloruro di sodio in acqua (3.1) e portare a 100 ml.

3.4. - Substrato tamponato: sciogliere in cilindro da 10 ml con tappo a smeriglio 0,5 g di fenilfosfato bisodico in 4,5 ml della soluzione (3.3), aggiungere 2 gocce di reattivo di Gibbs (3.6) e lasciar a riposo alla temperatura ambiente per 30 minuti. Estrarre il colore formatosi con 2,5 ml di alcol N-butilico e lasciare a riposo fino a separazione delle fasi. Eliminare la fase alcolica e ripetere l'estrazione prima dell'uso se la soluzione acquosa è colorata. Per preparare il substrato tamponato diluire 1 ml di questa soluzione a 100 ml con la soluzione (3.2).

3.5. - Precipitante al rame-zinco: sciogliere 6 g di solfato di zinco eptaidrato e 0,1 g di solfato di rame pentaidrato in acqua (3.1) e portare a 100 ml.

3.6. - Reattivo di Gibbs: sciogliere 40 mg di 2-6 dibromochinonclorimide in 10 ml di etanolo al 95% v/v; la soluzione è stabile in recipiente scuro in frigorifero per non oltre 1 mese e va comunque scartata quando cambi colore.

3.7. - Soluzione di solfato di rame: sciogliere 0,05 g di solfato di rame pentaidrato in acqua (3.1) e portare a 100 ml.

3.8. - Soluzione standard di fenolo: pesare esattamente 200 mg di fenolo puro, porli in pallone tarato da 100 ml portando a volume con acqua (3.1) e agitare: la soluzione è stabile per diversi mesi se conservata in frigorifero. Diluire 10 ml esattamente misurati con pipetta di precisione della soluzione standard a 1000 ml con acqua (3.1): 1 ml di questa soluzione contiene 20 microgrammi di fenolo. Usare questa soluzione per preparare delle soluzioni standard più diluite che contengano 2, 5, 10 e 20 microgrammi di fenolo/ml.

4. - *Apparecchiatura.*

4.1. - Bagnomaria termostatato a 37°C ± 1°C.

4.2. - Spettrofotometro.

5. - *Campionamento e preparazione.*

Vedi norma n. 1.

6. - *Procedura.*

6.1. - Determinazione.

6.1.1. - Pesare in due provette da 10 ml con tappo smeriglio 500 mg di campione; una delle due provette sarà usata come prova in bianco. Se il formaggio è molle e cremoso, pesare il campione su carta paraffinata 2 × 2 cm ed introdurre il tutto nella provetta.

6.1.2. - Aggiungere alla provetta del saggio in bianco 1 ml della soluzione (3.2) mescolare con una bacchetta di vetro che va lasciata dentro la provetta e scaldare per 2 minuti in acqua bollente. Ricoprire provetta e beker contenente l'acqua bollente con un foglio di alluminio per rendere uniforme il riscaldamento, raffreddare a temperatura ambiente e mescolare nuovamente.

6.1.3. - Aggiungere alla provetta per la determinazione 1 ml di soluzione (3.2) e mescolare accuratamente con bacchetta.

6.1.4. - Le due provette vanno trattate allo stesso modo; aggiungere 9 ml del substrato tamponato (3.4) e mescolare con le bacchette.

6.1.5. - Incubare immediatamente a bagnomaria a 37°C per 60 minuti mescolando occasionalmente. Scaldare in acqua bollente per due minuti nel modo indicato al punto (6.1.2), raffreddare con acqua corrente aggiungere 1 ml della soluzione precipitante (3.5) e mescolare accuratamente.

6.1.6. - Filtrare su carta da filtro da quantitativa, ripassando fino a che i filtrati risultino limpidi.

6.1.7. - Prelevare 5 ml dei filtrati pipettandoli in altrettante provette, aggiungere 5 ml del tampone (3.3) e 0,1 ml di reattivo di Gibbs (3.6) mescolare e far sviluppare il colore per 30 minuti a temperatura ambiente. Se la colorazione fosse troppo intensa (per quantità di fenolo superiori a 20 microgrammi per provetta) prelevare una aliquota ridotta della soluzione (6.1.6), portarla a 10 ml con il tampone (3.3) diluito 1:10 ed aggiungere ancora 0,1 ml del reattivo di Gibbs (3.6) lasciando sviluppare il colore per 30 minuti; diluire il bianco nello stesso modo.

6.1.8. - Misurare la D.O. del campione contro la prova in bianco a 610 nm.

6.2. - Preparazione della curva di taratura.

6.2.1. - Porre in provette 1 ml di acqua (3.1) ed 1 ml della soluzione standard (3.8) in modo da ottenere rispettivamente 2, 5, 10, 20 microgrammi di fenolo per provetta, e preparare contemporaneamente un riferimento mettendo in una provetta 2 ml di acqua (3.1).

6.2.2. - Aggiungere ad ogni provetta 1 ml della soluzione di solfato di rame (3.8), 5 ml di tampone diluito 1:10 (3.3), 3 ml di acqua (3.1) e 0,1 ml di reattivo di Gibbs (3.6), mescolare e lasciar sviluppare il colore per 30 minuti a temperatura ambiente.

6.2.3. - Misurare la D.O. delle soluzioni standard contro la soluzione di riferimento a 610 nm e costruire la curva di taratura.

7. - *Espressione dei risultati.*

7.1. - Calcolo.

Attività fosfatasica, espressa in microgrammi di fenolo per g di campione = 4,5 · P · N.

dove:

P = microgrammi di fenolo ricavati dalla curva di taratura;
N = fattore di diluizione da applicare solo se si è effettuata la diluizione di cui al punto (6.1.7).

7.2. - Ripetibilità.

Inferiore a 4 microgrammi di fenolo libero per g di prodotto.

8. - *Osservazioni.*

Per la determinazione impiegare soltanto materiale in vetro accuratamente lavato, evitando esposizione alla luce solare diretta e contaminazioni con saliva.

Bibliografia.

Norma FIL-IDF: 53: 1969.

26) RICONOSCIMENTO DELLE PROTEINE DI LATTE VACCINO IN FORMAGGI DI PECORA.

1. - *Scopo e campo di applicazione.*

Il metodo descritto permette il riconoscimento qualitativo delle proteine del siero di latte di vacca in formaggi dichiarati di origine ovina.

2. - *Principio del metodo.*

Le siero-proteine di latte vaccino, estratte dal formaggio in opportune condizioni, sono evidenziate, mediante analisi immunochimica in campo elettrico (cross-over) su un supporto di acetato di cellulosa, usando un siero specifico anti-bue. Gli estratti ottenuti da formaggi sicuramente di latte di pecora, non danno alcuna reazione di immunoprecipitazione con il siero anti-bue.

3. - *Reattivi.*

3.1. - Soluzione fisiologica: sciogliere 8,77 g di cloruro sodio in acqua e portare a 1000 ml.

3.2. - Soluzione tampone tris-citrico pH 8,7: sciogliere 9,2 g di tris (idrossimetil) amino metano e 1,05 g di acido citrico in acqua e portare a 1000 ml.

3.3. - Soluzione colorante di Blu di Comassie allo 0,1% in una miscela di alcool metilico-ac. acetico glaciale-acqua (50:10:40 v/v).

3.4. - Soluzione decolorante: miscela di alcool metilico-acido acetico glaciale-acqua (47,5:5:47,5 v/v).

3.5. - Acido acetico 5%.

3.6. - Siero precipitante anti-bue (conservare a 4°C).

4. - *Apparecchiatura.*

4.1. - Alimentatore da elettroforesi a voltaggio costante capace di erogare 200 V.

4.2. - Camera umida per elettroforesi con relativi accessori.

4.3. - Agitatore a piastra rotante.

4.4. - Striscie di acetato di cellulosa per uso immunochimico.

4.5. - Mascherina per deposizione tipo cross-over.

4.6. - Micropipette o microcaps da 5 microlitri.

4.7. - Vaschette in plastica con coperchio per condizionamento, lavaggio, colorazione, decolorazione e fissaggio delle striscie.

4.8. - Buste di politene.

4.9. - Saldatrice per buste di politene.

4.10. - Centrifuga da laboratorio con provette da 30 ml.

5. - *Campionamento e preparazione.*

Vedi norma n. 1.

6. - *Procedura.*

6.1. - Estrazione.

6.1.1. - Aggiungere a 5 g di formaggio grattugiato o macinato 15 ml di soluzione fisiologica (3.1) ed agitare su agitatore magnetico per almeno 1 ora.

6.1.2. - Travasare la miscela in provette da centrifuga e centrifugare a 3000 rpm per 15 minuti.

6.1.3. - Eliminare la parte grassa superficiale e prelevare la parte liquida (basta un'aliquota) trasferendola in una seconda provetta.

6.2. - Preparazione del supporto.

6.2.1. - Condizionamento: collocare la striscia di acetato di cellulosa in una vaschetta contenente il tampone triscitrico (3.2). Chiudere la vaschetta e mettere su agitatore a piastra rotante per 10 minuti per far assorbire il tampone.

6.2.2. - Estrarre la striscia dalla vaschetta ed asciugarla premento dolcemente fra due fogli di carta da filtro per evitare deformazioni del supporto.

6.2.3. - Deporre la striscia sul ponte elettroforetico con la parte opaca rivolta verso l'alto e bloccarla in modo che rimanga tesa; mettere in posizione sul ponte la mascherina da cross-over.

6.3. - Esecuzione del saggio.

6.3.1. - Sul ponte preparato per l'immediata deposizione come in (6.2) ancora umido e posto su di un foglio di carta da filtro all'esterno della camera elettroforetica (4.2), depositare 5 microlitri di estratto (6.1) dalla parte del catodo e 5 microlitri di antisiero (3.6) dalla parte dell'anodo utilizzando le serie dei 6 fori centrali della mascherina. La distanza fra le due semine sarà di circa 6 mm. Le serie di fori centrali della mascherina permettono di eseguire sei analisi contemporaneamente.

6.3.2. - Togliere la mascherina, mettere il ponte nella camera elettroforetica già contenente la soluzione tampone (3.2) ed applicare un voltaggio di 200 volts per 15 minuti.

6.3.3. - Estrarre il ponte, togliere la striscia e metterla in una vaschetta contenente la soluzione (3.1); agitare su agitatore (4.3) per almeno 2 ore, cambiando tre volte la soluzione di lavaggio.

6.3.4. - Trasferire la striscia in una vaschetta contenente la soluzione colorante (3.3) e lasciarvela per 10 minuti senza agitare.

6.3.5. - Passare la striscia in un'altra vaschetta contenente la soluzione decolorante (3.4) ed agitarla in agitatore (4.3) fino a decolorazione (pochi minuti).

6.3.6. - Volendo conservare la striscia immergerla in una vaschetta contenente acido acetico al 5% per 5 minuti e quindi porla in una busta di politene trasparente assieme a poche gocce di acido acetico al 5%; termosaldare la busta.

7. - *Interpretazione dei risultati.*

7.1. - La presenza di proteine del siero di latte bovino è evidenziata da una o più linee di precipitazione, a seconda della concentrazione dell'antigene, fra il punto di semina dell'estratto e quello dell'antisiero.

7.2. - Normalmente il siero anti-bue non dà reazione crociata con le sieroproteine del latte di pecora. È opportuno comunque provare ogni nuovo lotto di antisieri con un estratto di formaggio di pecora sicuramente genuino.

8. - *Sensibilità del metodo.*

Nelle condizioni descritte ed in funzione del titolo in siero precipitante (che diminuisce col tempo dal momento della sua produzione) è possibile individuare linee di precipitazione in campioni che contengono proteine da latte vaccino in quantità minima del 2% sulla totalità delle proteine presenti. L'analisi è effettuabile senza diluizioni dell'estratto finale, qualunque sia la concentrazione di proteine del latte vaccino. Il caglio di vitello non dà reazione con il siero anti-bue.

9. - *Espressione dei risultati.*

La comparsa di una linea di precipitazione fra i punti di semina dell'estratto e dell'antisiero si esprime con la dizione: proteine di latte vaccino presenti.

È opportuno ripetere per controllo la determinazione utilizzando un siero antimontone al posto del siero anti-bue; si evidenziano così la presenza di proteine ovine senza alcuna diluizione.

Bibliografia.

MONACELLI e CANTAGALLI: *Boll. Lab. Chim. Prov.*: 26, 360 (1975).

FLEGO: *Boll. Lab. Chim. Prov.*: 33, 547 (1982).

Visto, *il Ministro dell'agricoltura e delle foreste*
PANDOLFI

86A3250

GIUSEPPE MARZIALE, *direttore*

DINO EGIDIO MARTINA, *redattore*
FRANCESCO NOCITA, *vice redattore*

(7651750) Roma - Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato - S.